



Etude des communautés microbiennes fonctionnelles benthiques impliquées dans le cycle du méthane (Lac du Bourget)

Elodie Billard

► To cite this version:

Elodie Billard. Etude des communautés microbiennes fonctionnelles benthiques impliquées dans le cycle du méthane (Lac du Bourget). Biodiversité et Écologie. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. <NNT : 2015GREAA017>. <tel-01252691>

HAL Id: tel-01252691

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01252691>

Submitted on 8 Jan 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biodiversité, Ecologie, Environnement**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par **Elodie BILLARD**

Thèse dirigée par **Isabelle DOMAIZON** et **Emilie LYAUTEY**

Préparée au sein du **Laboratoire CARRTEL**

Dans l'**École Doctorale SISEO**

Etude des communautés microbiennes fonctionnelles benthiques impliquées dans le cycle du méthane (Lac du Bourget)

Thèse soutenue publiquement le **17 juillet 2015**

Devant le jury composé de :

Bernard MONTUELLE

Directeur de recherche, UMR CARRTEL

INRA, Thonon les bains

Président du jury

Clarisse MALLET

Maître de conférences, UMR LMGE

Université Blaise Pascal

Rapporteur

Stéphane PESCE

Chargé de recherche

IRSTEA, Lyon

Rapporteur

Frédéric GARABETIAN

Professeur, UMR EPOC

Université Bordeaux 1

Examineur

Isabelle DOMAIZON

Directrice de recherche, UMR CARRTEL

INRA, Thonon les bains

Directrice de thèse

Emilie LYAUTEY

Maître de conférences, UMR CARRTEL

Université Savoie Mont Blanc

Encadrante de thèse



A la mémoire de
Catherine Marie Billard

Résumé

Les communautés microbiennes benthiques participent activement au recyclage de la matière organique et de fait au fonctionnement biogéochimique des écosystèmes lacustres. Ces communautés comportent de nombreux phyla mais leur diversité fonctionnelle est encore incomplètement connue. Ce travail vise à appréhender les modifications de structure et d'abondance des gènes fonctionnels en lien avec la distribution spatiale verticale (liée au gradient d'oxydoréduction), la variabilité spatiale horizontale (zone côtière vs pélagique) et la dynamique saisonnière liée au brassage de la colonne d'eau (ré-oxygénation des interfaces benthiques), de même que l'identification de la diversité des méthanotrophes et des méthanogènes.

Pour cette étude, des carottes sédimentaires ont été prélevées sur un transect zone côtière – zone pélagique, à différentes dates au cours d'un cycle annuel. Chaque carotte sédimentaire a été analysée dans la verticalité entre l'interface eau-sédiment et 20 cm. Les communautés microbiennes participant au cycle du méthane ont été ciblées par 2 gènes de fonction et étudiées en termes de structure, de diversité et d'abondance; par ailleurs, des marqueurs phylogénétiques ont été utilisés pour caractériser les communautés bactériennes et archéennes totales.

Les résultats de l'étude spatiale montrent que, si à l'échelle locale (station d'échantillonnage) une relative homogénéité des communautés microbiennes (totales et fonctionnelles) est observée, des variabilités fortes sont détectées d'une part à l'échelle des transects horizontaux en lien avec des changements de conditions environnementales et d'autre part dans la verticalité des sédiments sous l'effet des conditions d'oxydoréduction. La communauté bactérienne étant la plus affectée dans la verticalité, avec des changements de structure entre toutes les strates étudiées. Dans cette même étude, une analyse comparative de la structure des communautés (totales et fonctionnelles) a démontré que l'analyse d'échantillons individuels permettait d'obtenir un plus grand nombre d'OTU que l'analyse des mêmes échantillons regroupés en *pools*.

Les résultats de l'étude de la dynamique temporelle des communautés méthanogènes et méthanotrophes révèlent des changements de structure et abondance, principalement à l'interface eau - sédiment en lien avec la dynamique d'oxygénation du lac. Quant à l'analyse de la diversité, elle montre une dominance des *Methanomicrobiales* (*Methanoregula* principalement) pour les méthanogènes, mais les *Methanosarcinales* (*Methanosarcina*) et les *Methanobacteriales* (*Methanobacterium*) ont également été identifiés. Pour les méthanotrophes, la diversité est dominée par *Methylobacter* en zone profonde et par *Methylococcus* en zone côtière, les méthanotrophes de Type II (*Methylosinus* et *Methylocystis*) ont aussi été identifiés.

L'ensemble de ces travaux souligne l'importance de prendre en compte, à la fois la variabilité spatiale (horizontale et verticale) et la variabilité temporelle, des communautés méthanogènes et méthanotrophes lors de l'étude de ces communautés. Les changements quant à leurs structures et leurs abondances sont des paramètres non négligeables pour comprendre les processus impliqués dans le cycle du méthane.

Mots-clés : Ecologie fonctionnelle – Cycles biogéochimiques – Sédiments lacustres – Méthanotrophes – Méthanogènes – Variabilité spatio-temporelle

Abstract

Benthic microbial communities are actively involved in organic matter recycling and affect biogeochemical functioning of lake ecosystems. These communities comprise many phyla but their functional diversity is still incompletely known. This study is focused on the benthic microbial communities involved in the methane cycle in lacustrine systems. We aimed understanding the structural and abundance changes of functional genes related to the vertical distribution (redox gradient in sediment), the horizontal variability (coastal vs. pelagic benthic zone) and seasonal dynamics related to mixing of the water column (re-oxygenation of benthic interface). The composition of methanotrophic and methanogenic communities was characterized by sequencing analyses.

For this study, sedimentary cores were sampled along a transect from coastal to pelagic zone, at different times during an annual cycle. In addition, each sediment core was analyzed in its verticality from the water-sediment interface to 20 cm depth. Microbial communities involved in the cycle of methane (methanogenesis and methanotrophy) were targeted by 2 functional genes (*mcrA* and *pmoA*). Furthermore, phylogenetic markers were used to characterize the total bacterial and archaeal communities. These communities are studied in terms of structure (genotyping), diversity (sequencing) and abundance (qPCR, DNA) of their functional genes.

The results of the study showed that, on a spatial scale, a low heterogeneity was detected for a given sampling station in terms of structure of microbial communities (total and functional), however, a high variability was detected both at an horizontal scale along a transect (coastal vs. pelagic zone), due to contrasted environmental conditions, and at a vertical scale (upper to deeper layers in the core) under the effect of redox conditions. The bacterial community being the most affected in the verticality, with structural changes among all strata studied. In the same study, a comparative analysis of the structure (for all of the communities), between pooled samples and individual samples, demonstrated that the analysis of individual samples provided a greater number of OTU for the majority of microbial communities.

Moreover the study of the temporal dynamic of methanogen and methanotroph communities revealed changes in the structure and abundance, mainly at the water - sediment interface, according to the oxygenation levels that varied through time. The analysis of diversity showed a dominance of *Methanomicrobiales* (*Methanoregula* mainly) for methanogens, but *Methanosarcinales* (*Methanosarcina*) and *Methanobacteriales* (*Methanobacterium*) were also identified. The methanotrophs' community was dominated by *Methylobacter* on deeper stations and by *Methylococcus* in coastal station. Type II methanotrophs (*Methylosinus* and *Methylocystis*) were also identified.

This work highlights the importance of taking into account both the spatial variability (horizontal and vertical) and the temporal variability of methanogen and methanotroph communities. Changes on their structures and abundances are significant parameters for understanding the processes involved in the methane cycle.

Keywords: Functional Ecology - Biogeochemical cycles - Freshwater sediments - Methanotrophs - Methanogens - Spatiotemporal variability

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du Centre Alpin de Recherche sur les Réseaux Trophiques et Ecosystèmes Limniques (UMR INRA - Université Savoie Mont Blanc) avec le soutien financier du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Je tiens tout d'abord à témoigner ma gratitude et mes plus sincères remerciements à Clarisse MALLET et Stéphane PESCE qui me font l'honneur de rapporter mon travail de thèse. De même qu'à Bernard MONTUELLE et Frédéric GARABETIAN qui ont accepté d'évaluer mon travail.

Je tiens à remercier Bernard MONTUELLE, directeur du laboratoire CARRETEL et Etienne DAMBRINE, directeur adjoint, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire.

Je tiens à remercier mes directrices de thèse, Isabelle DOMAIZON et Emilie LYAUTEY, qui ont encadré mes travaux. Merci pour votre soutien au quotidien, votre disponibilité malgré des emplois du temps chargés, votre aide et surtout de m'avoir toujours encouragée ces dernières années.

Merci à tous ceux qui m'ont aidé à réaliser les prélèvements sur le Lac, qu'il pleuve, qu'il neige ou qu'il fasse soleil... merci à Gérard PAOLINI (CALB), Emmanuel MALLET du laboratoire EDYTEM, Emilie LYAUTEY, Annie MILLERY, Nathalie TISSOT et Jean Christophe EUSTACHE. De même qu'un immense merci à Cécile PIGNOL pour sa logistique lors de nos sorties sur le terrain.

Je tiens à remercier très chaleureusement Jean Philippe JENNY, spécialiste des trous dans les sédiments du Lac du Bourget, pour m'avoir aidé à en faire quelques un mais aussi pour son aide lors de l'ouverture des carottes. Merci pour nos discussions « sédimento » et toutes les autres aussi, ce fut toujours un plaisir.

Merci à Cécile CHARDON et Nathalie TISSOT pour leur aide en biologie moléculaire au nom de toutes ses PCR dont les résultats « bizarres » n'ont pas trouvé d'explications. Un merci plus particulièrement à Nadine CURT GRAND GAUDIN (NCGG *alias* chef biomol') pour avoir pris le temps de répondre aux millions de questions que je t'ai posée ces dernières années sur la biomol'. Et merci aussi pour toutes nos discussions, même les plus bizarres sur

le sexage de tes bestioles (à quand le sexe des Anges ?), sur les plantes, les crottes... ce fut aussi divertissant qu'enrichissant.

Je ne peux pas oublier de remercier les « Rmen » du LECARRTEL : Pascal, Antoine, Florent et Jim. Merci pour avoir répondu à toutes mes questions sur l'insondable logiciel R et de m'avoir dépatouillé plus d'une fois.

Je tiens à remercier Annie MILLERY, pour son aide sur la physico-chimie mais aussi pour toutes nos discussions diverses et variées. Je tiens particulièrement à te remercier pour ton écoute, ton soutien et tes encouragements au cours de ces années

Merci à Agnès MILLET, pour les discussions du vendredi après-midi quand il ne restait plus que nous dans le labo.

Un merci aux doctorants : Benjamin pour sa bonne humeur permanente, Yann pour son écoute et son soutien, Julie pour nos sorties détentes le plus souvent drôles, parfois bizarres mais tout le temps décontractantes, à Marjorie, Tiphaine et Johanna pour tous ces apéros, repas, pique-niques... en espérant en faire encore beaucoup d'autres avec vous.

Merci à Roxane VEGH, pour ses 2 stages effectués au labo et qui m'a beaucoup aidée dans la mise au point des protocoles.

Et un merci à tous les membres du LECARRTEL, pour ces quelques années passées ensembles.

Enfin je voudrai remercier mes parents, qui m'ont toujours soutenu dans ce que je voulais faire et sans qui je ne serais pas là aujourd'hui. Merci à ma sœur Marie et Virginie pour leur soutien depuis tant d'années et tout ce que vous m'apportez au quotidien. Enfin, un immense merci à Franck pour m'avoir supportée ces dernières années, pour ton soutien en toutes circonstances et pour ta chasse aux fautes d'orthographe dans ce manuscrit.

« Il n'y a pas de réussite facile ni d'échecs définitifs »

Marcel Proust

Sommaire

INTRODUCTION & OBJECTIFS	23
CHAPITRE I - SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	31
I. Le méthane	33
1. Sources de méthane atmosphérique	34
2. Transport du méthane dans les lacs et émission vers l'atmosphère	35
3. Les écosystèmes lacustres : émetteurs de méthane ?	38
II. Le cycle du méthane	40
1. La méthanogénèse	40
i. Production de méthane à partir de matière organique	40
ii. Les différentes voies métaboliques de la méthanogénèse	41
2. La méthanotrophie	43
i. Le méthane comme source d'énergie	43
ii. Les différentes voies métaboliques de la méthanotrophie	44
iii. Voies métaboliques et acteurs microbiens de l'oxydation anaérobie du méthane (AOM)	45
III. Les acteurs du cycle du méthane	49
1. Outils et marqueurs moléculaires pour l'étude des communautés méthanogènes et méthanotrophes	49
2. Méthanogénèse et méthanotrophie : enzymes clés et marqueurs fonctionnels	52
i. Méthanogénèse : la méthyl coenzyme M réductase	52
ii. Méthanotrophie : la méthane mono oxygénase	54
3. Les méthanogènes : producteurs de méthane	56
i. Classification	56
ii. Physiologie	58
iii. Ecologie	59
4. Les méthanotrophes : consommateurs de méthane	61
i. Classification	61
ii. Physiologie	63
iii. Ecologie	63
5. Les ANME : méthanotrophes anaérobies	66
i. Identification des ANME	66
ii. L'AOM dans les lacs	70
IV. Distribution des communautés méthanogènes et méthanotrophes dans les sédiments lacustres	71
1. Diversité et distribution des méthanogènes dans les sédiments lacustres	73
2. Diversité et distribution des méthanotrophes dans les sédiments lacustres	76

CHAPITRE II - MATERIELS ET METHODES	81
I. Stratégie d'étude	83
1. Une approche écosystémique en lac profond	83
2. Choix et caractéristique des stations d'échantillonnages le long d'un transect de profondeur	83
3. Stratégie d'échantillonnage à différentes échelles spatiales : de l'échelle intra-carotte aux comparaisons inter-stations le long d'un transect	85
4. Les sédiments appréhender dans leur verticalité	86
5. Etude des variations temporelles à l'échelle annuelle	86
6. Les communautés microbiennes étudiées et les descripteurs sédimentaires	86
II. Présentation du site d'étude	89
1. Généralités	89
2. Les sédiments du Lac du Bourget	91
III. Echantillonnage et caractérisation des sédiments	94
1. Taux d'humidité	94
2. Taux de matière organique et de carbonates	95
3. Taux de carbone et d'azote total	95
4. Analyse de la taille des particules	96
5. Analyses statistiques concernant les caractéristiques sédimentaires	96
IV. Etude des communautés microbiennes benthiques	96
1. Mesure de l'abondance virale et procaryotique	96
2. Analyse de la composition phénotypique des communautés microbiennes benthiques	97
3. Extraction de l'ADN des sédiments	99
4. Analyse de structure	99
5. Analyse de la diversité	105
6. Analyse d'abondance des communautés méthanogènes et méthanotrophes dans les sédiments	105
7. Analyses statistiques concernant les communautés microbiennes	107
CHAPITRE III – ETUDE DE LA VARIABILITE SPATIALE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES BENTHIQUES A MULTI - ECHELLE	109
Avant propos	111
I. Introduction	111
II. Résultats	112
III. Discussion	114
IV. Article & Données complémentaires	116

V. Analyse complémentaire	142
----------------------------------	------------

CHAPITRE IV – ETUDE DE LA VARIABILITE TEMPORELLE DES COMMUNAUTES METHANOGENES ET METHANOTROPHES BENTHIQUES

I. Introduction	147
------------------------	------------

II. Rappel concernant la stratégie d'étude et les aspects méthodologiques	149
--	------------

III. Résultats	150
-----------------------	------------

1. Caractérisation des stations d'échantillonnage et des sédiments échantillonnés	150
2. Analyse de la composition phénotypique des communautés microbiennes benthiques	153
3. Structure, diversité et abondance des communautés méthanogènes	154
i. Analyse de la variabilité spatio-temporelle de la structure	154
ii. Composition taxonomique des méthanogènes	156
iii. Abondance des méthanogènes	158
4. Structure, diversité et abondance des méthanotrophes	159
i. Analyse de la structure et de la variabilité spatio-temporelle	159
ii. Composition taxonomique des méthanotrophes	164
iii. Abondance des méthanotrophes	164
5. Co-structuration entre méthanogènes et méthanotrophes	165

IV. Discussion	166
-----------------------	------------

1. Influence de l'oxygène sur les méthanogènes	167
2. La dynamique des méthanogènes sous contrôle de la matière organique	167
3. Variations temporelles de la structure et de l'abondance des méthanotrophes	168
4. Co-variations de la structure et de l'abondance des méthanogènes et des méthanotrophes	170

V. Conclusion	171
----------------------	------------

CHAPITRE V – DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. Limites méthodologiques à l'étude des communautés microbiennes benthiques	175
---	------------

II. Facteurs de contrôle de la distribution des communautés méthanogènes et méthanotrophes dans les sédiments lacustres	176
--	------------

1. Cas des méthanotrophes	176
2. Cas des méthanogènes	177

III. Diversité des communautés méthanogènes et méthanotrophes dans les sédiments lacustres	178
---	------------

IV. Perspectives d'études des communautés microbiennes benthiques impliquées dans le cycle du méthane	180
--	------------

1. Etude de la variabilité spatio-temporelle	180
2. Etude des communautés actives	181
3. Oxydation anaérobie du méthane	182
CONCLUSION GENERALE	185
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	189

Liste des abréviations

AAA : Archaea Associated AOM

ADNr : Acide Désoxyribonucléique ribosomal

ANME : ANaerobic MEthanotroph

ANOSIM : Analysis of SIMilarity

AOM : Anaerobic Oxydation of Methane

ARISA : Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis

BSA : Bovine Serum Albumine

DMSO : Dymethylsulfoxide

dNTPs : désoxyribonucléotides

FISH / CARD FISH : CAlyzed Reporter Deposition Fluorescent In Situ Hybridization

ITS : Intergenic Spacer

MCR : Methyl co-enzyme M réductase

MMO (p ou s) : Méthane mono - oxygenase (forme particulière ou soluble)

NDMO : Nitrogen Driven anaerobic Methane Oxydation

nMDS : non-Metric Dimensional Scaling

OTU : Operational Taxonomic Unit

PCR : Polymerase Chain Reaction

PFLA : Phospholipid Fatty Acid

ppb : part par billion (milliard)

qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction

RFI : Relative Fluorescent Intensity

RuMP : Ribulose MonoPhosphate

SDMO : Sulfate reduction – Dependant Methane Oxidation

SOERE OLA : Système d'Observation et d'Expérimentation au long terme pour la Recherche en Environnement – Observatoire des Lacs Alpains

SRB : Sulfate Reducing Bacteria (Bactérie sulfato - réductrice)

Tg : 10¹² grammes

T-RFLP : Terminal - Restriction Fragment Length Polymorphism

Liste des Figures

Figure 1 : Evolution de la concentration atmosphérique du méthane depuis 1750.....	33
Figure 2 : Représentation des proportions entre les sources de méthane anthropiques et naturelles contribuant au bilan global du méthane atmosphérique.	34
Figure 3 : Illustration des différents types de transports du méthane dans les écosystèmes lacustres : A, non stratifiés et B, stratifiés.....	37
Figure 4 : Illustration de la dernière étape de la méthanogénèse.	41
Figure 5 : Schéma des différentes voies métaboliques de la méthanogénèse. La méthanogénèse peut être réalisée à partir de (A) CO ₂ /H ₂ , (B) d'acétate ou (C) de méthanol..	43
Figure 6 : Schéma des différentes voies d'oxydation du méthane.	45
Figure 7 : Les différentes voies métaboliques chez <i>Candidatus 'Methyloirabilis oxyfera'</i> , a) la dénitrification, b) la méthanotrophie et c) voie de l'oxydation anaérobie du méthane couplé à la dénitrification.....	48
Figure 8 : Interaction entre les populations d'Archées ANME-2d et les bactéries NC10.....	48
Figure 9 : Techniques de biologie moléculaire permettant l'étude des communautés méthanogènes et méthanotrophes.....	51
Figure 10 : Structure des opérons des isoenzymes MCR I et II de la méthyl coenzyme M réductase.....	53
Figure 11 : Comparaison des arbres phylogénétiques des méthanogènes issus de la sous-unité <i>alpha</i> de la méthyl coenzyme M réductase (<i>mcrA</i>) et du gène codant l'ARNr 16S.....	53
Figure 12 : Structure des opérons de la méthane mono oxygénase, (A) soluble, (B) particulaire.....	54
Figure 13 : Comparaison des arbres phylogénétiques des méthanotrophes issus de l'ADNr 16S et de la sous unité <i>alpha</i> de la méthane mono oxygénase particulaire.....	55
Figure 14 : Phylogénie et taxonomie des méthanogènes. L'arbre a été construit à partir de la méthode de Neighbour-Joining d'après les séquences de l'ADNr 16S. La famille des <i>Methanoflorentaceae</i> , nouvellement décrite, compte actuellement une seule espèce	

Candidatus 'Methanoflorens stordalenmirens' est à ajouter dans l'ordre des *Methanocellales*. 57

Figure 15 : Arbre phylogénétique des méthanotrophes aérobies et de la division NC10 (méthanotrophes anaérobies) d'après les séquences de l'ADNr 16S. L'arbre a été construit à partir de la méthode de Neighbour-Joining avec des valeurs de bootstrap. Le genre *Methylacidimicrobium*, nouvellement décrit, est à inclure dans la famille des *Verrucomicrobia*. 62

Figure 16 : ANME observées en épifluorescence par FISH ou CARD-FISH, (a) ANME-1 cellules seules, (b) ANME – 1 en consortium avec *Desulfosarcina*, (c, d, e) ANME – 2a en consortium avec *Desulfosarcina*, (f, g) ANME – 2c en consortium avec *Desulfosarcina*, (h) ANME – 2c cellules seules et (i) ANME – 3 en consortium avec *Desulfolobus*. 67

Figure 17 : Comparaison des arbres phylogénétiques de l'ADNr16S et du gène *mcrA* basée sur des séquences environnementales et des espèces méthanogènes. Les valeurs de bootstraps sont basées sur 1000 réplicats et seules les valeurs supérieures à 50% sont indiquées. L'arbre a été enraciné avec *Methylocadococcus spp.*.... 69

Figure 18 : Représentation du cofacteur F₄₃₀ chez les ANME et schéma de la dernière étape de la méthanogénèse et la première de la méthanogénèse inverse dans l'oxydation anaérobie du méthane par les ANME. 70

Figure 19 : Schéma bilan des principales voies de production, de consommation et d'émission du méthane dans les écosystèmes lacustres. Illustration d'une carotte sédimentaire par une photo d'une carotte prélevée en mai 2011 sur le Lac du Bourget. 72

Figure 20 : Localisation des 3 stations d'échantillonnage et représentation de l'échantillonnage dans la verticalité des sédiments sur une carotte prélevée en Décembre 2011 sur la station 2 du Lac du Bourget. 85

Figure 21 : Carte bathymétrique du Lac du Bourget et de ses principaux affluents. 90

Figure 22 : A gauche illustration des lamines saisonnières dans les sédiments du Lac du Bourget sur une carotte prélevée en mai 2011 à 110 m de profondeur. A droite, description macroscopique et microscopique des sédiments du Lac du Bourget. 92

Figure 23 : A gauche, diagramme ternaire représentant les taux de sables, de limons et d'argiles dans les sédiments du Lac du Bourget. A droite, représentation de la distribution des tailles de particules sédimentaires totales et de la contribution des particules carbonatées. 93

Figure 24 : Représentation de la variation temporelle des abondances virales et procaryotiques en nombre de cellules par gramme de matière organique en fonction de la profondeur dans les sédiments du Lac du Bourget. Les abondances sont représentées par des

cercles noirs en mai 2011, par des cercles gris en octobre 2011 et par des cercles blancs en février 2012. 94

Figure 25 : En haut, photographie illustrant la réaction de coloration lors de l'utilisation des sources carbonées. En bas, grille récapitulative des différentes sources de carbone testées avec l'EcoPlate Biolog. 98

Figure 26 : Diagramme de Venn représentation la répartition des OTU méthanotrophes entre les 3 stations étudiées 142

Figure 27 : Variations des paramètres physico-chimiques dans les sédiments du Lac du Bourget pour les stations 1, 2 et 3. Les sédiments ont été caractérisés en termes de taux d'humidité, de matière organique, de carbonates, de carbone et d'azote total, ainsi que la taille médiane des particules. 151

Figure 28 : Exemple de comparaison de 2 carottes sédimentaires prélevées sur la station 3 en octobre et décembre 2011 dans le Lac du Bourget. Les traits rouges représentent les strates échantillonnées entre 0 et 20 cm de profondeur sur chacune des carottes. Les traits noirs en pointillés montrent les lamines correspondant aux mêmes strates sédimentaires..... 152

Figure 29 : ACP effectuée avec le pourcentage de l'activité microbienne de chaque guild (P_x) après 7 jours d'incubation. L'axe 1 représente 62,4 % et l'axe 2, 23,6% de la variance. A droite, diagramme en étoile représentant l'utilisation des guildes carbonées (en %) pour chacune des dates et stations d'échantillonnage..... 153

Figure 30 : nMDS réalisé à partir des distances de Bray – Curtis pour les méthanogènes. Pour chaque station, les dates sont représentées avec des cercles pour mai 2011, des carrés pour octobre 2011, des triangles pour décembre 2011 et des croix pour février 2012..... 154

Figure 31 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences issues du clonage du gène *mcrA*. L'arbre a été construit en utilisant la méthode du *Neighbor-joining*, et enraciné avec *Methanopyrus kandlerii*. Seules les valeurs de bootstraps supérieures à 50 sont indiquées.. 156

Figure 32 : Représentation de l'abondance des méthanogènes analysés par PCR quantitative sur le gène *mcrA*, exprimé en nombre de copies de *mcrA* par gramme de sédiments frais. A gauche abondance des méthanogènes en fonction de la profondeur sédimentaire entre 0 et 20 cm pour chaque station. A droite représentation des variations temporelles de l'abondance des méthanogènes dans la strate d'interface uniquement pour chaque station (pour les mois de mai 2011, octobre 2011, décembre 2011 et février 2012..... 158

Figure 33 : Pour chaque station, représentation d'un nMDS à partir des distances de Bray–Curtis pour les méthanotrophes. Les dates sont représentées avec des cercles pour mai 2011, des carrés pour octobre 2011, des triangles pour décembre 2011 et des croix pour février 2012..... 159

Figure 34 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences issues du clonage du gène *pmoA*. L'arbre a été construit en utilisant la méthode du *Neighbor-joining*. Seules les valeurs de bootstraps supérieures à 50 sont indiquées. 162

Figure 35 : Représentation de l'abondance des méthanotrophes analysés par PCR quantitative sur le gène fonctionnel *pmoA*, exprimé en nombre de copies de *pmoA* par gramme de sédiments frais. A gauche abondance des méthanotrophes en fonction de la profondeur sédimentaires entre 0 et 20 cm pour chaque station. Au centre représentation des variations temporelle de l'abondance des méthanotrophes dans la strate d'interface et à droite dans la strate 4-5 cm pour chaque station pour les mois de mai 2011, octobre 2011, décembre 2011 et février 2012. 165

Figure 36 : Représentation bi-dimensionnelle de la solution graphique de l'analyse procrustéenne. La structure des communautés méthanogènes et des méthanotrophes sont représentés. Les dates d'échantillonnages sont indiquées par la couleur des flèches. 166

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Description des principales caractéristiques chez les <i>Methanomicrobiales</i> , <i>Methanosarcinales</i> , <i>Methanobacteriales</i> et <i>Methanococcales</i>	59
Tableau 2 : Description des caractéristiques physiologiques des bactéries méthanotrophes. 65	
Tableau 3 : Tableau récapitulatif de la stratégie d'échantillonnage, des analyses moléculaires et physico-chimiques réalisées pour l'étude de la dynamique spatiale et temporelle des communautés microbiennes benthiques dans les sédiments du Lac du Bourget.	88
Tableau 4 : Caractéristiques du Lac du Bourget (Jenny, 2013)	89
Tableau 5 : Protocoles des réactions d'amplification PCR des communautés bactériennes, archéenne, méthanogènes et méthanotrophes dans les sédiments du Lac du Bourget. Les concentrations de chaque réactif correspondent aux concentrations finales dans le milieu réactionnel.	101
Tableau 6 : Cycles d'amplifications PCR utilisés pour les communautés bactériennes, archéennes, méthanogènes et méthanotrophes. Pour chaque communauté, on trouvera la référence bibliographique de laquelle est tirée le protocole de base, ainsi que la température, le temps et le nombre de cycles pour chacune des étapes de la réaction.	102
Tableau 7 : Cycles d'amplification en qPCR pour les communautés méthanogènes et méthanotrophes. Pour chaque communauté les températures, les durées et le nombre de cycles utilisés pour chaque étape sont indiqués.	106
Tableau 8 : Tableau récapitulatif de la stratégie d'échantillonnage des analyses effectuées	149
Tableau 9 : Variation temporelle de l'intensité relative de fluorescence de la structure des méthanogènes, dans la strate d'interface des sédiments de la station 2, en mai 2011, octobre 2011, décembre 2011 et février 2012. Pour chaque T-RF, la contribution à la variabilité temporelle et son affiliation phylogénétique ont été indiqués.....	155
Tableau 10 : Analyse SIMPER décrivant la contribution des T-RFs méthanotrophes à la variabilité temporelle pour chacune des stations. Pour chaque T-RF, est indiquée sa contribution à la variabilité temporelle pour chacune des stations étudiées.	160
Tableau 11 : Variabilité temporelle de l'intensité relative de fluorescence des T-RF, dans les 5 premiers centimètres des sédiments pour chaque station d'échantillonnage.	161

Introduction & Objectifs

Dans les écosystèmes lacustres, le compartiment benthique est une zone hétérogène formée notamment par des processus de dépôt et de décomposition de la matière organique provenant du bassin versant et de la colonne d'eau (Pourriot & Meybeck, 1995 ; Scala & Kerkhof, 2000). Les sédiments forment un compartiment où les procaryotes jouent un rôle majeur. Ces derniers sont impliqués dans tous les cycles biogéochimiques et participent au recyclage de la matière organique (Fenchel *et al.*, 1998 ; Wetzel, 2000 ; Madsen *et al.*, 2011). Les sédiments sont caractérisés, dans leur verticalité, par un gradient d'oxydoréduction marqué (Froelich, 1979) qui induit une zonation des microorganismes et de leurs activités. La diminution rapide de la concentration en oxygène dissous et la disparition rapide des accepteurs terminaux d'électrons dans la verticalité des sédiments favorise la mise en place de processus anoxiques tel celui de la méthanogénèse (Garcia *et al.*, 2000). Les microorganismes impliqués dans le cycle du méthane libèrent du dioxyde de carbone et du méthane lors du recyclage de la matière organique (Conrad, 1996 ; Pearl & Steppe, 2003 ; Schultz & Urban, 2008). La méthanogénèse est l'étape finale de la dégradation de la matière organique, le méthane produit peut être ensuite libéré dans la colonne d'eau puis vers l'atmosphère (Bastviken *et al.*, 2004). Au cours de son acheminement vers l'atmosphère le méthane peut être oxydé, lorsque les conditions sont favorables, par méthanotrophie (Krause *et al.*, 2010). Le bilan atmosphérique du méthane, issu des écosystèmes lacustres, est par conséquent, la résultante d'un équilibre entre les processus de méthanogénèse et de méthanotrophie assurés par les communautés microbiennes.

La méthanogénèse est réalisée exclusivement par des archées, généralement en conditions anoxiques (Garrity & Holt, 2001) alors que la méthanotrophie est un processus réalisé le plus souvent par des bactéries en conditions oxiques (Conrad, 2009). La diversité de ces deux communautés est relativement bien connue (p. ex. Borrel *et al.*, 2011), en revanche leurs distributions dans les sédiments lacustres et les facteurs environnementaux influençant leurs structures, leurs abondances et leurs activités sont encore mal compris (Chaudhary *et al.*, 2013 ; Chowdhury & Dick, 2013). L'étude de ces communautés dans les sédiments lacustres passe par la détermination des différentes échelles de variabilité, à la fois spatiale et temporelle. L'hétérogénéité des sédiments lacustres est à l'origine d'une variabilité spatiale des communautés microbiennes, à la fois horizontale, en lien avec des apports de matières organiques qualitativement et quantitativement différents (p. ex. allochtones en zone littorale vs. autochtones en zone profonde) (Deutzman *et al.*, 2011), et verticale (gradient

d'oxydoréduction, Chan *et al.*, 2005). La dynamique saisonnière lacustre, à la fois thermique et biologique, est également à l'origine de variations spatio-temporelles des conditions environnementales. Celles-ci sont induites par des changements d'oxygénation à l'interface eau-sédiment, des apports de nutriments et de matières organiques dans les sédiments lacustres (Trolle *et al.*, 2009) qui façonnent la diversité des communautés microbiennes et leurs activités.

Des études récentes ont montré l'importance des lacs en tant que sources de méthane (EPA, 2009 ; Bastviken *et al.*, 2011 ; Yang *et al.*, 2011 ; Milucka *et al.*, 2015), notamment les lacs profonds ayant un hypolimnion anoxique permettant le stockage d'importantes quantités de méthane (Bastviken *et al.*, 2004). De plus, il existe des différences d'émissions de méthane entre les zones littorales et pélagiques et ce phénomène est encore plus important dans les lacs profonds (Bussmann *et al.*, 2013 ; Chen *et al.*, 2013 ; Schilder *et al.*, 2013 ; Soja *et al.*, 2013). En conséquence, la compréhension de la distribution des méthanogènes et des méthanotrophes dans les sédiments lacustres, de même que les facteurs environnementaux qui la structurent, revêt un caractère important. Afin d'appréhender les changements dans la distribution spatiale de ces communautés microbiennes dans les sédiments du Lac du Bourget (lac péri alpin profond), trois stations d'échantillonnage, ayant des conditions environnementales contrastées, ont été étudiées. Ces stations se situent le long d'un transect allant d'une zone côtière (soumises aux apports allochtones du principal affluent du Lac) à une zone pélagique profonde (soumise aux apports autochtones du Lac et à sa dynamique temporelle – stratification *vs.* brassage).

L'étude de la distribution des communautés méthanogènes et méthanotrophes dans les sédiments du Lac du Bourget s'articule autour de 2 objectifs :

- (i) Le premier vise à caractériser les variations de la structure des communautés méthanogènes et méthanotrophes à plusieurs échelles spatiales (horizontale et verticale). Pour cela plusieurs réplicats d'extrait ADN ont été effectués au sein de chaque strate sédimentaire permettant d'évaluer l'hétérogénéité de la structure des communautés microbiennes benthiques à l'échelle intra-carotte (entre 5 réplicats au sein d'une strate). A une échelle spatiale horizontale supérieure, l'étude de la variabilité de la structure des communautés microbiennes a été réalisée au niveau intra-station (comparaisons de plusieurs carottes au sein d'une même station) et

enfin au niveau inter-station (comparaisons des stations d'échantillonnages le long du transect).

En parallèle à cette approche spatiale horizontale, l'hétérogénéité verticale dans les sédiments est prise en compte (comparaison inter-strates sédimentaires).

Cette analyse ciblant les communautés fonctionnelles est réalisée en regard des communautés microbiennes totales (bactéries et archées) auxquelles elles appartiennent. Ceci permet d'étudier de possibles co-structurations entre les communautés totales et fonctionnelles. Enfin, les relations entre la structure des communautés microbiennes et les paramètres environnementaux ont été testées.

Dans un premier temps, ce travail permet de répondre à des questionnements méthodologiques, à savoir :

- Les extraits ADN doivent-ils être analysés séparément ou en les regroupant en *pool* ?
- Combien de réplicats faut-il analyser pour caractériser la structure des communautés méthanogènes et méthanotrophes benthiques?
- Combien de carottes sédimentaires sont nécessaires, au sein des stations d'échantillonnage, pour l'étude de la structure des communautés microbiennes benthiques ?

Les hypothèses de travail testées, quant à la variabilité spatiale, ont été les suivantes :

- Les communautés microbiennes totales (bactéries et archées) ayant une diversité plus importante que les communautés fonctionnelles (méthanogènes et méthanotrophes), et donc des préférences écologiques plus diversifiées, devraient être caractérisées par des changements de structure plus importants, à la fois à l'échelle verticale (inter-strate) et à l'échelle horizontale (intra-station).
- A l'échelle horizontale, la structure des communautés microbiennes benthiques (totales et fonctionnelles) devrait être plus comparable au sein d'une station d'échantillonnage (entre plusieurs carottes au sein d'une même station), du fait de faibles variations de conditions environnementales, qu'elles ne le sont au niveau inter-stations, c'est à dire le long du transect zone côtière – zone pélagique, du fait de conditions environnementales contrastées.

- A l'échelle verticale, la structure de l'ensemble des communautés étudiées devrait changer dans la verticalité sédimentaire, en lien avec de possibles changements de conditions d'oxydoréduction (surface vs. sédiment profond). Les communautés microbiennes totales, ayant des préférences écologiques diversifiées, devraient être affectées de changements de structure plus importants entre chaque strate sédimentaire que les communautés fonctionnelles, dont les préférences écologiques sont plus spécifiques.
- (ii) Le second objectif vise à appréhender les variations de structure et d'abondance des méthanogènes et des méthanotrophes, en lien avec la dynamique temporelle lacustre (stratification vs. brassage), et à identifier la diversité de ces deux communautés fonctionnelles. Cette étude a été réalisée sur les mêmes stations d'échantillonnage (le long du transect) et dans la verticalité des sédiments. La dynamique temporelle est observée grâce à plusieurs dates d'échantillonnage sélectionnées au cours de l'année en fonction de la dynamique de stratification de la colonne d'eau (stratification vs. brassage) et en lien avec les variations d'oxygénation à l'interface eau-sédiment (oxique vs. anoxique).

Les hypothèses de travail testées, quant à la variabilité temporelle, ont été les suivantes :

- Les changements d'oxygénation à l'interface eau-sédiment devraient affecter différemment la structure et l'abondance des communautés méthanogènes et méthanotrophes en fonction des stations d'échantillonnage. Les variations d'oxygénation étant plus fortes sur la station d'échantillonnage la plus profonde (subissant plusieurs mois d'anoxie), l'amplitude des modifications, de structure et d'abondance, devrait être plus importante sur cette station que sur les autres.
- Pour une variation d'oxygénation à l'interface eau-sédiment identique pour les deux communautés (augmentation ou baisse de la saturation en oxygène), la réponse des méthanogènes et des méthanotrophes, devraient être opposée du fait de leurs différences de préférences écologiques en termes d'oxygénation.
- L'interface eau-sédiment est soumise à des variations d'oxygénation, contrairement aux strates plus profondes. Ces variations d'oxygénations modifient la localisation de l'interface oxique/anoxique entre les premiers

millimètres des sédiments et l'hypolimnion ce qui induit des changements de conditions d'oxydoréduction dans la verticalité des sédiments. L'ensemble de ces changements pourrait avoir une influence sur la structure et/ou l'abondance des communautés benthiques dans la profondeur des sédiments.

Ce manuscrit est structuré en 5 chapitres :

- une synthèse bibliographique décrivant les processus que sont la méthanogénèse et la méthanotrophie, les acteurs les réalisant, ainsi que l'état des connaissances concernant la distribution de ces communautés dans les sédiments lacustres et les facteurs environnementaux qui les influencent.
- une partie 'matériel et méthodes' décrivant la stratégie d'étude et d'échantillonnage des sédiments à l'échelle spatiale et temporelle ainsi que le site d'étude, les méthodes utilisées pour l'analyse de la structure, de l'abondance et de la diversité des communautés microbiennes benthiques.
- le chapitre 3 présente les résultats acquis concernant l'étude de l'hétérogénéité et la variabilité spatiale des communautés microbiennes benthiques totales, méthanogènes et méthanotrophes.
- le chapitre 4 présente les résultats relatifs à la variabilité temporelle des communautés méthanogènes et méthanotrophes dans les sédiments en lien avec la dynamique saisonnière (thermique et biologique) lacustre.
- la dernière partie du manuscrit est consacrée à la discussion générale et aux perspectives d'études qui découlent de ces travaux.

Chapitre I

-

Synthèse bibliographique

I. Le méthane

Le méthane, CH_4 , fut découvert à la fin du XVIII^{ème} siècle par Alessandro Volta. En 1776, il décrit ses premières expériences sur un gaz inflammable qui s'échappe des sédiments littoraux du lac Majeur en Italie (Reeburgh, 2007). Il est le plus simple des hydrocarbures avec un seul atome de carbone. Puissant gaz à effet de serre, au même titre que le dioxyde de carbone (CO_2) et le protoxyde d'azote (N_2O), il fait partie de la liste des gaz dont les émissions anthropiques doivent être réduites d'après le protocole de Kyoto. Sa durée de vie dans l'atmosphère est de 8 ans (Conrad, 2009) et son forçage radiatif est de $+ 0,48 \text{ W.m}^2$ (compris entre $+ 0,43$ et $+ 0,53 \text{ W.m}^2$, IPCC, 2007). Le forçage radiatif est une mesure (énergie reçue / énergie émise) permettant d'évaluer l'impact de certains facteurs climatiques sur l'équilibre énergétique du système Terre / atmosphère. Un forçage radiatif positif, pour un facteur ou un ensemble de facteurs, signifie une augmentation de l'énergie du système Terre / atmosphère et donc va entraîner un réchauffement climatique. Le méthane a le second forçage radiatif le plus important, après celui du CO_2 ($+ 1,66 \text{ W.m}^2$, IPCC, 2007), mais il est estimé que, sur une période de 100 ans, une molécule de méthane a un impact sur le réchauffement global 25 fois supérieur au CO_2 (Solomon, 2007). Dans le contexte actuel de réchauffement climatique, la concentration de méthane atmosphérique est devenue un enjeu important, d'autant plus qu'au cours du seul XX^{ème} siècle, sa concentration a doublé. D'après l'European Environment Agency la concentration de méthane dans l'atmosphère est passée de 900 ppb en 1900 à 1800 ppb actuellement (Figure 1), pour un bilan global, de méthane émis dans l'atmosphère, estimé entre 500 et 600 $\text{Tg CH}_4.\text{an}^{-1}$ (Conrad, 2009).

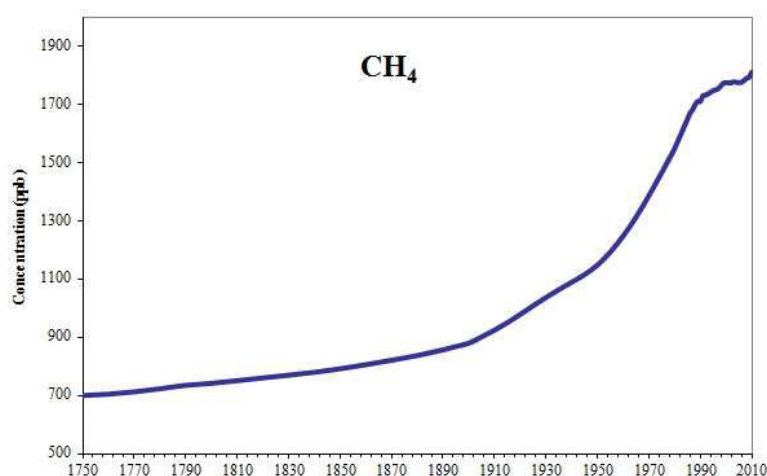


Figure 1 : Evolution de la concentration atmosphérique du méthane depuis 1750 (en partie par milliard (ppb)). Source : European Environment Agency.

1. Sources de méthane atmosphérique

Un écosystème émetteur de méthane est appelé « écosystème source » car il va libérer une quantité significative de méthane de manière à augmenter la concentration atmosphérique. A l'inverse, un écosystème qui est capable de le stocker est appelé « écosystème puit ». Tous les écosystèmes ne sont pas équivalents en termes d'émission de méthane. Celui-ci est produit à hauteur de 37% par des processus naturels (Figure 2), c'est à dire qu'environ 2/3 du méthane actuellement émis dans l'atmosphère est produit par des processus anthropiques. Parmi les écosystèmes naturels, les zones humides sont de loin les écosystèmes qui émettent le plus de méthane (environ 70% des sources naturelles), les écosystèmes lacustres arrivant en seconde position avec 13% des émissions de méthane vers l'atmosphère pour un bilan moyen de 30 Tg $\text{CH}_4.\text{an}^{-1}$ (Figure 2). Les écosystèmes aquatiques (eaux douces et océans) sont aussi d'importants consommateurs de méthane, plus de 80% de la production brute serait consommée au sein même de l'écosystème (Reeburg, 2007), ceci diminuant fortement le bilan d'émission de ces milieux.

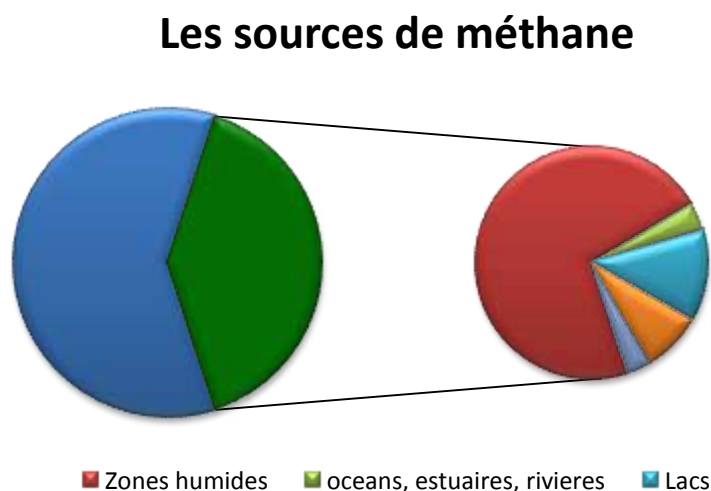


Figure 2 : Représentation des proportions entre les sources de méthane anthropiques (bleu, 63%) et naturelles (vert, 37%) contribuant au bilan global du méthane atmosphérique (566 Tg $\text{CH}_4.\text{an}^{-1}$), d'après le rapport 2010 de l'EPA (United State Environmental Protection Agency). Les sources naturelles sont séparées en 6 catégories : les zones humides (71,6%, rouge), les océans, estuaires et rivières (3,8%, vert clair), le permafrost (0,2% en violet), les lacs (12,6%, turquoise), les arthropodes terrestres (principalement les termites, 8,4%, orange) et les animaux sauvages (3,4%, bleu clair).

Toutefois les chiffres sur les émissions de méthane par les écosystèmes (notamment lacustres) tendent à évoluer vers une augmentation des estimations. Plusieurs facteurs peuvent expliquer ces évolutions : une meilleure connaissance des processus microbiens impliqués dans le cycle du méthane (notamment les facteurs environnementaux influençant la production et la consommation de méthane dans l'environnement), une meilleure compréhension du cycle en lui même (notamment des modes de transport du méthane vers l'atmosphère) et l'actuel réchauffement climatique qui est à l'origine d'une augmentation des températures à de hautes latitudes. Ce dernier point est à l'origine d'une diminution importante de la surface couverte par des zones englacées qui sont d'importants puits de méthane, entraînant la libération du méthane piégé et donc l'augmentation des émissions vers l'atmosphère.

2. Transport du méthane dans les lacs et émission vers l'atmosphère

Les estimations des émissions de méthane par les écosystèmes varient beaucoup en fonction des études, les méthodes de mesures et les modèles de prédiction utilisés pouvant tous deux être en cause. Mais les variations entre les estimations sont aussi dues aux modes d'émissions du méthane. En effet, le méthane peut être transporté à partir des écosystèmes lacustres vers l'atmosphère par différentes voies et les études ne les prennent pas forcément toutes en compte.

Dans les lacs, le méthane est produit dans les zones anoxiques sédimentaires, ou dans l'hypolimnion lorsque la colonne d'eau est stratifiée, puis il est transporté vers l'atmosphère via 4 voies principales décrites par Bastviken *et al.* (2004) :

- a. Le bullage : il s'agit de la formation de bulles de méthane, ceci se produit lorsque la concentration en méthane dépasse la limite de solubilité (à 20°C, 0,023 g.kg⁻¹ d'eau). La température et la pression hydrostatique sont 2 paramètres influençant ce mode de transport qui sera favorisé dans les écosystèmes de faibles profondeurs et les zones littorales où la pression hydrostatique est plus faible et la température plus élevée (Figure 3). Cette voie représenterait entre 40 et 60% des émissions de méthane atmosphérique (Bastviken *et al.*, 2004) dans les écosystèmes lacustres.
- b. La diffusion : le méthane peut être transporté des zones anoxiques vers les zones oxygénées par diffusion, qui est un transport lent, principalement dans les zones où

l'on retrouve des gradients comme dans la thermocline. L'émission du méthane vers l'atmosphère par diffusion dépend de la différence de concentration entre les 2 compartiments. La turbulence, par exemple le vent, peut être un accélérateur de diffusion du méthane entre l'eau et l'atmosphère (Figure 3). Bastviken *et al.* (2004) ont observé une corrélation entre la taille des lacs et le phénomène de diffusion : le taux de diffusion augmentant avec la taille du lac et pouvant ainsi contribuer à plus de 50% des émissions de méthane dans les grands lacs.

- c. Le brassage : dans les lacs stratifiés, le méthane peut s'accumuler dans les couches anoxiques de la colonne d'eau (hypolimnion) permettant ainsi son stockage. Le méthane peut être libéré de ces zones de stockage, par diffusion, pendant les périodes de brassages saisonniers (Figure 3). Le volume de méthane stocké est variable selon la profondeur des lacs, leurs tailles et la durée des périodes d'anoxie, ce qui le rend difficilement évaluable. D'autant plus que sa libération est temporaire. Ce mode de transport peut contribuer jusqu'à 45% des émissions de méthane par les lacs (Bastviken *et al.*, 2004).
- d. Les plantes : dans les zones littorales lacustres la végétation peut être un vecteur de méthane vers l'atmosphère (Figure 3). Les racines sont constituées d'un tissu aérifère (aérenchyme) qui contient des canaux avec de larges cavités qui permettant les échanges gazeux (oxygène, éthylène, méthane...) entre les parties dans et hors de l'eau. Ce transport par les plantes représenterait 1 à 15% des émissions de méthane en fonction du couvert de plantes (Bastviken *et al.*, 2004).

Une grande partie du méthane produit par les écosystèmes aquatiques est consommée au cours de son transport vers l'atmosphère, environ 30 à 99% selon les estimations (Bastviken *et al.*, 2008). Ainsi le méthane émis par les écosystèmes lacustres ne représenterait qu'une faible partie du carbone total produit par ces mêmes écosystèmes (10% environ, Tranvik *et al.*, 2009). Le méthane qui n'est pas dégradé au cours de son transport arrive finalement dans l'atmosphère où la plus grande partie subit une oxydation photochimique avec les radicaux hydroxyl, OH (environ 90% d'après Kirschke *et al.*, 2013).

Dans l'atmosphère le méthane capte une partie du rayonnement infrarouge émis par la Terre. Il empêche ainsi les rayonnements d'être évacués et participe donc au réchauffement climatique. Il est primordial, dans le contexte actuel, d'une part, de réduire des apports de méthane d'origine anthropique et, d'autre part, d'identifier les acteurs impliqués dans la

production et la dégradation du méthane d'origine biologique dans l'ensemble des écosystèmes.

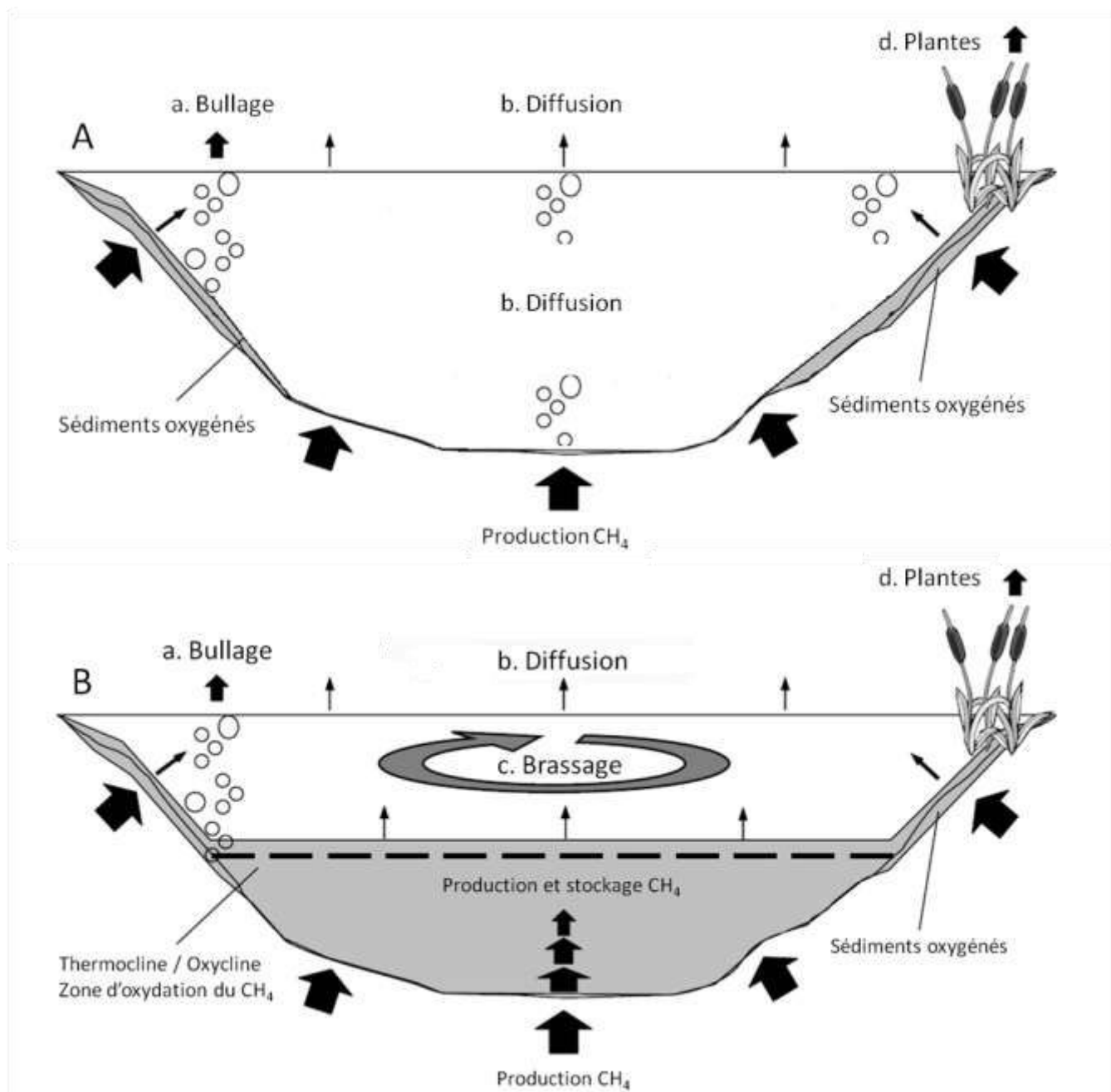


Figure 3 : Illustration des différents types de transports du méthane dans les écosystèmes lacustres : A, non stratifiés et B, stratifiés d'après Bastviken *et al.*, (2004).

3. Les écosystèmes lacustres : émetteurs de méthane ?

Les estimations de méthane produit, consommé et émis vers l'atmosphère par les écosystèmes lacustres varient en fonction des études. Ainsi le rapport de l'EPA (2009) estime que les lacs émettent en moyenne $30 \pm 20 \text{ Tg CH}_4.\text{an}^{-1}$ en prenant en compte les estimations publiées lors de la rédaction de ce rapport (Bastviken *et al.*, 2004 : estimation comprise entre 8 et $48 \text{ Tg CH}_4.\text{an}^{-1}$ et Reeburgh, (2007) : $10 \text{ Tg CH}_4.\text{an}^{-1}$). Toutefois, des études plus récentes tendent à montrer que ces chiffres sont bien en dessous de la réalité. Bastviken *et al.* (2011) revoient leurs estimations d'émission de méthane par les écosystèmes d'eau douce à la hausse. Lors de cette étude, ils ajoutent aux lacs, les réservoirs et les rivières, permettant ainsi de prendre en compte les données de 474 écosystèmes d'eau douce à différentes latitudes. Bastviken *et al.*, (2011) estiment ainsi à $104 \text{ Tg CH}_4.\text{an}^{-1}$ les émissions pour les écosystèmes d'eau douce. Pour les seuls écosystèmes lacustres cette étude prend en compte les données d'émissions (bullage, diffusion et stockage) de 97 lacs et estime les émissions de méthane à $72 \text{ Tg CH}_4.\text{an}^{-1}$. Bien que cette étude englobe un grand nombre de lacs, les estimations d'émission de méthane sont probablement encore sous estimées. Ainsi Yang *et al.* (2011) estiment que rien que pour les lacs de Chine, qui n'ont pas été inclus dans l'étude de 2011, $3 \text{ Tg CH}_4.\text{an}^{-1}$ seraient à rajouter au bilan de Bastviken *et al.* (2011). Quelques soient les études sur les écosystèmes lacustres, un point commun ressort de celles-ci : les lacs sont des sources de méthane, et, malgré la petite proportion que ceux-ci occupent sur Terre (0,9%, Downing *et al.*, 2006), ils apportent une grande contribution aux émissions de méthane dans l'atmosphère.

La difficulté de réaliser des estimations fiables peut être expliquée par plusieurs facteurs en lien avec :

- la superficie du lac qui influence le stockage et la diffusion du méthane : plus la superficie est importante, plus le stockage est important et moins il y a de diffusion (Bastviken *et al.*, 2004)
- la profondeur maximum de la colonne d'eau et le volume de la fraction anoxique : lorsqu'elles augmentent, elles entraînent un accroissement de la capacité de stockage (Bastviken *et al.*, 2004)
- la surface couverte par les macrophytes : bien que peu prise en compte elle pourrait également être un facteur important (Bastviken *et al.*, 2004).

Au sein d'un lac, les émissions de méthane sont hétérogènes et des différences sont observées entre les zones pélagiques et littorales. Plusieurs études récentes (Bussmann *et al.*, 2013 ; Chen *et al.*, 2013 ; Schilder *et al.*, 2013 ; Soja *et al.*, 2013) montrent que les émissions de

méthane dans les écosystèmes lacustres sont supérieures dans les zones littorales car le méthane n'a pas le temps d'être consommé ou dissous dans la colonne d'eau avant d'arriver à l'interface eau-air contrairement aux zones pélagiques. Le phénomène est d'autant plus marqué dans les lacs profonds où les zones pélagiques n'émettent quasiment pas de méthane (Bussmann *et al.*, 2013 ; Schmid *et al.*, 2013).

Dans les lacs monomictiques et dimictiques, l'hypolimnion tend à devenir hypoxique voire anoxique ce qui en fait une zone propice à l'accumulation de méthane (Bastviken *et al.*, 2004). Lors du brassage saisonnier, le méthane accumulé dans l'hypolimnion est libéré dans l'ensemble de la colonne d'eau. Cette libération est intense et rapide, créant ainsi des pics saisonniers d'émissions de méthane. Fernandez *et al.* (2014) démontrent que 46% du méthane stocké dans l'hypolimnion est émis lors du brassage saisonnier et qu'il représente 80% des émissions annuelles. Les lacs de hautes latitudes présentent une rythmicité similaire, ils accumulent du méthane dans la colonne d'eau durant les périodes de gel (glace à l'interface eau-air), empêchant celui-ci d'être libéré dans l'atmosphère. Lors du dégel, à la saison chaude, ces lacs libèrent de grandes quantités de méthane correspondant entre 12 et 100% de leurs émissions annuelles (Karlson *et al.*, 2013). Ces lacs sont relativement peu étudiés alors qu'ils présentent un fort potentiel de production de gaz à effet de serre. Tous les lacs ne vont pas être égaux en termes d'émissions de méthane du fait de leurs différentes caractéristiques morphologiques, géologiques, physico-chimiques, d'où l'importance d'étudier des lacs avec des morphologies contrastées, à différentes profondeurs (littoral vs. pélagique) et sur des transects de distance en rapport avec des différences d'apports de matière organique (autochtone vs. allochtone) afin d'estimer au mieux les émissions des écosystèmes lacustres.

Les émissions de méthane de 2 lacs brésiliens avec des états trophiques différents ont été comparées (Palma-Silva *et al.*, 2013). Ces deux lacs présentent des pics estivaux d'émissions de méthane, mais la concentration en méthane dans la colonne d'eau est plus importante dans le lac eutrophe (Biguás Lake) que dans le lac oligo-mésotrophe (Polegar Lake). Cet exemple spécifique illustre le rôle potentiel de l'état trophique et de la dynamique biologique saisonnière sur les flux de méthane dans les écosystèmes lacustres. Par conséquent, pour faire une estimation optimale des émissions de méthane par un écosystème lacustre il faut prendre en compte plusieurs points sur un transect de distance entre les zones littorales et pélagiques, à différentes dates en fonction de la rythmicité saisonnière du lac étudié et mesurer les différents types de transports de méthane. Ceci montre bien la complexité de l'estimation des bilans de CH₄ dans ces écosystèmes.

II. Le cycle du méthane

1. La méthanogénèse

i. Production de méthane à partir de matière organique

Le méthane est l'un des produits terminaux de la dégradation de la matière organique par des processus biochimiques en conditions anaérobies. Dans un premier temps, la matière organique est hydrolysée en macromolécules plus simples (protéines → acides aminés, lipides → acides gras, polysaccharides → osides) par des bactéries hydrolytiques. Dans un second temps, les macromolécules formées précédemment vont être transformées en acides gras volatiles (acide gras propionique, butyrique...), en alcool (éthanol, ...), en acides organiques (acide lactique, ...) et en hydrogène et CO₂ par des bactéries fermentatives. Dans un troisième temps, les bactéries acétogènes vont transformer les composés issus des phases précédentes en précurseurs du méthane, à savoir acétate, H₂ et CO₂. Enfin dans une dernière étape, le méthane sera produit par méthanogénèse. Il est généralement produit par les archées méthanogènes en conditions anaérobies ; toutefois, de récentes études montrent la possibilité d'une méthanogénèse en condition aérobie (Grossart *et al.*, 2011 ; Tang *et al.*, 2014). La méthanogénèse peut être réalisée à partir de différents précurseurs mais les donneurs d'électrons principaux sont le dihydrogène (H₂), le formate et l'acétate, parfois des alcools peuvent être utilisés tels que le 2-propanol, le 2-butanol ou encore l'éthanol. Bien que les substrats de départ ne soient pas toujours les mêmes, l'étape finale de la formation du méthane fait toujours intervenir le methyl-coenzyme M. Ce dernier va réagir avec le coenzyme B (CoB-SH) pour former un hétérodisulfide (CoM-S-S-CoB) et du méthane (Figure 4) sous l'action d'une enzyme la methyl-coenzyme M réductase (Hedderich & Whittman, 2006).

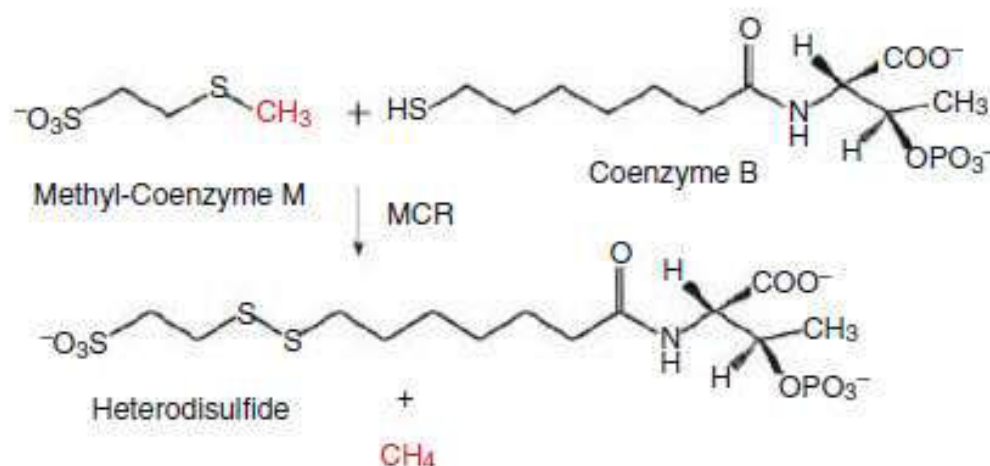


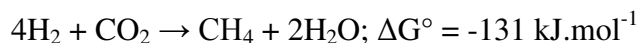
Figure 4 : Illustration de la dernière étape de la méthanogénèse (Hedderich & Whitman, 2006). Abréviation : MCR : Méthyl Coenzyme M Reductase.

La production de méthane est contrôlée par des facteurs environnementaux tels que la disponibilité en oxygène, des conditions strictement anaérobies lors de la méthanogénèse favorisent de forts taux de production de méthane (Lehours *et al.*, 2005). Le substrat est lui aussi un paramètre déterminant car les méthanogènes sont en compétition avec d'autres organismes (SRB, bactéries dénitrifiantes...) pour l'accès au dihydrogène et à l'acétate (Borrel *et al.*, 2011), tout comme la qualité et la quantité de matière organique (Schulz & Conrad, 1995 ; Schwarz *et al.*, 2008). Duc *et al.* (2010) ont montré que dans les sédiments lacustres, la production de méthane est directement liée au ratio C:N de la matière organique, lorsque celui ci est faible (< 10) le taux de production de méthane est plus élevé que lorsque que le ratio C:N est élevé (> 10). L'influence de ces paramètres sur les méthanogènes, dans les écosystèmes lacustres, est décrite plus en détails dans la dernière partie de ce chapitre.

ii. Les différentes voies métaboliques de la méthanogénèse

Comme nous l'avons vu, la méthanogénèse peut se faire à partir de différents précurseurs. Il existe 3 grandes voies métaboliques (Conrad, 2007) :

- a. Méthanogénèse hydrogénotrophe (Figure 5A) : le méthane est produit à partir de CO₂ et d'H₂ selon l'équation suivante :



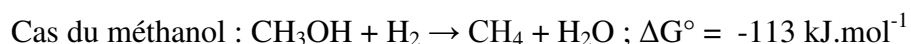
L'énergie est produite lors de la réduction d'un hétérodisulfide (CoM-S-S-CoB) issu de la dernière étape de la réaction. Cette voie métabolique consomme le dihydrogène produit par les bactéries fermentatives ; ainsi, méthanogènes et bactéries fermentatives forment des consortiums syntrophiques permettant de maintenir de faibles concentrations d'H₂ dans le milieu (conditions nécessaires aux bactéries fermentatives, Stams & Plugge, 2009). Cette voie métabolique contribue en grande partie à la production de méthane dans l'environnement (Conrad, 1999).

- b. Méthanogénèse acétoclastique (Figure 5B) : l'acétate est transformé en CH₄ et CO₂ selon l'équation suivante :



L'acétate est clivé en 2, le groupement carboxyl (COOH) est oxydé en CO₂ et le groupement méthyl (CH₃) est réduit en CH₄. Dans cette voie métabolique le groupement méthyl rentre directement dans la voie des C1 à l'avant dernière étape de la méthanogénèse. Cette voie métabolique est principalement réalisée dans les écosystèmes d'eaux douces, froides et tempérées (Borrel *et al.*, 2011).

- c. Méthanogénèse méthylotrophique (Figure 5C) : les composés méthylés (méthanol, méthyl sulfides, méthylamines...) sont transformés en CH₄ et CO₂ selon l'équation suivante :



Le groupement méthyl (CH₃) est réduit en méthyl-coenzyme M puis en méthane. Un groupe méthyl additionnel est oxydé afin d'obtenir le nombre d'électrons nécessaires (6) pour réaliser la voie inverse des C1 et libérer du CO₂. En présence de groupe méthyl donneur et de H₂, l'oxydation du groupe méthyl est inhibée et la totalité des groupements méthyl est réduite en méthane (Hedderich & Whitman, 2006).

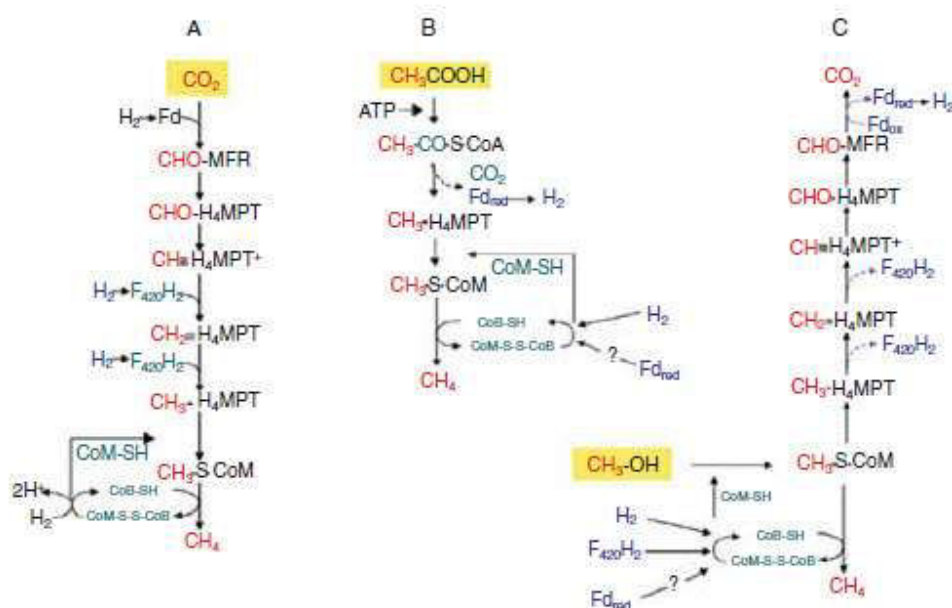
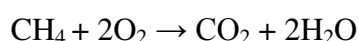


Figure 5 : Schéma des différentes voies métaboliques de la méthanogénèse (Hedderich & Whitman, 2006). La méthanogénèse peut être réalisée à partir de (A) CO_2/H_2 , (B) d'acétate ou (C) de méthanol. Abréviations : CHO-MFR, *N*-formylmethanofuran ; CHO- H_4MPT , *N*-formyltetrahydromethanoptérin ; $\text{CH}=\text{H}_4\text{MPT}$, *N*⁵,*N*¹⁰-methenyl-tetrahydromethanoptérin ; $\text{CH}_2=\text{H}_4\text{MPT}$, *N*⁵,*N*¹⁰-methylene-tetrahydromethanoptérin et $\text{CH}_3-\text{H}_4\text{MPT}$, *N*⁵-methyl-tetrahydromethanoptérin.

2. La méthanotrophie

i. Le méthane comme source d'énergie

La méthanotrophie est une oxydation biologique du méthane en condition aérobie réalisée par les bactéries méthanotrophes. Elle fut décrite dès le début du 20^{ème} siècle par Sohngen (1906). Dans les années 1970 une oxydation anaérobie du méthane a aussi été décrite, nous la détaillerons à la fin de cette partie. La méthanotrophie, en condition aérobie, permet l'utilisation du méthane comme source de carbone et d'énergie et est réalisée selon l'équation suivante :



L'oxydation se déroule en 4 étapes, tout d'abord le méthane est transformé en méthanol, puis en formaldéhyde, en formate et finalement en dioxyde de carbone (Hanson & Hanson, 1996) :



Le formaldéhyde est un intermédiaire clef dans la méthanotrophie. L'assimilation du formaldéhyde peut se faire à partir de différentes voies (cf paragraphe suivant) qui ne seront pas réalisées par les mêmes espèces de méthanotrophes (cf III.3.i).

Dans les écosystèmes lacustres la méthanotrophie est contrôlée par différents paramètres environnementaux. La disponibilité du méthane et de l'oxygène sont des paramètres indispensables. Les taux de consommation du méthane dans les écosystèmes lacustres sont les plus élevés à l'interface oxique / anoxique, c'est à dire dans les premiers centimètres des sédiments lacustres, mais aussi dans l'oxycline lorsque la colonne d'eau est stratifiée. Les taux d'oxydation du méthane varient dans le temps, les écosystèmes lacustres stratifiés vont potentiellement libérer de très grandes quantités de méthane au moment du brassage saisonnier. Durant ces périodes de brassage la colonne d'eau est aussi très oxygénée, le cumul de ces 2 paramètres (brassage + oxygène) favorise de très forts taux d'oxydation du méthane dans la colonne d'eau. Des études ont montré que l'ajout d'ammonium (NH_4^+) dans le milieu inhibe la méthanotrophie (Bosse *et al.*, 1993, Bodelier & Laanbroek, 2004), ceci s'explique par une compétition entre les 2 molécules dont la structure chimique est similaire (CH_4 et NH_4^+). Pour finir, le broutage par les ciliés, les flagellés, les amibes et les chironomes (Muraze & Frenzel, 2007 ; Deines *et al.*, 2007) influe directement sur les communautés de méthanotrophes et donc sur la consommation de méthane de celles-ci. L'influence de ces paramètres sur les méthanotrophes, dans les écosystèmes lacustres, est décrite plus en détails dans la dernière partie de ce chapitre.

ii. Les différentes voies métaboliques de la méthanotrophie

Nous avons vu que la méthanotrophie commence par la transformation du méthane en méthanol puis en formaldéhyde. L'assimilation du formaldéhyde est une étape importante de la méthanotrophie pouvant se faire par 2 voies métaboliques (Figure 6) :

- la voie du ribulose monophosphate (RuMP) : ce fut la première découverte par Quayle et collaborateurs dans les années 1960 (Hanson & Hanson, 1996). Dans cette voie 3 moles de formaldéhyde sont assimilées pour former 3 intermédiaires carbonés (hexulose-6-phosphate, fructose-6-phosphate et glycéraldéhyde-phosphate). Le glycéraldéhyde final peut ensuite être assimilé par les cellules ou être réarrangé pour former du ribulose-5-phosphate et recommencer un cycle. Cette voie serait un précurseur de l'évolution du cycle de Calvin (Hanson & Hanson, 1996).

- la voie de la sérine : dans cette voie 2 moles de formaldéhyde et 1 mol de CO_2 sont assimilées. Le formaldéhyde va réagir avec la glycine pour former la sérine, celle-ci sera ensuite utilisée dans des réactions de transaminations par les cellules (Hanson & Hanson, 1996).

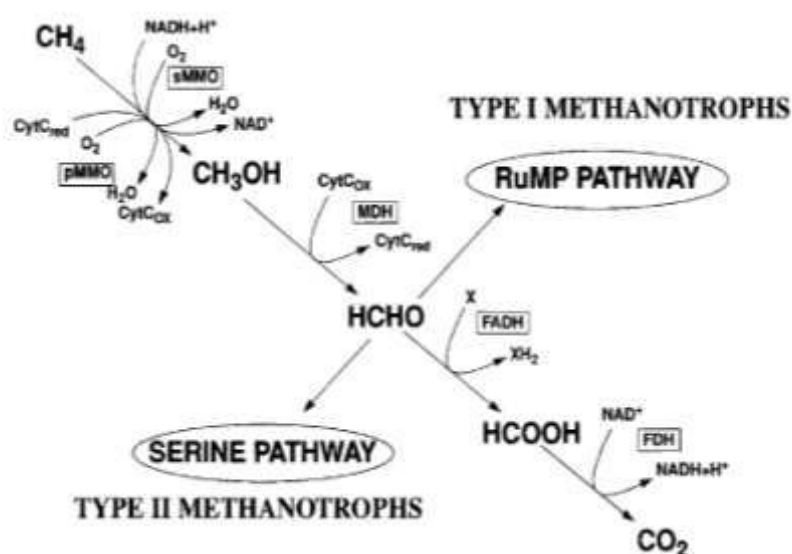


Figure 6 : Schéma des différentes voies d'oxydation du méthane (Hanson & Hanson, 1996). Abréviation : RuMP, Ribulose monophosphate.

iii. Voies métaboliques et acteurs microbiens de l'oxydation anaérobie du méthane (AOM)

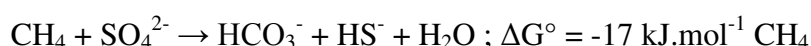
La méthanotrophie est un processus classiquement décrit comme aérobie, toutefois, depuis les années 70, des études (Martens & Berner, 1974 ; Barnes & Goldberg, 1976 ; Reeburgh, 1976) confirment la possibilité d'une oxydation du méthane en condition anaérobie

(AOM = Anaerobic Oxidation of Methane). Les premières observations prouvent une disparition du méthane produit dans des environnements anoxiques au niveau d'une zone riche en sulfates avant même la présence d'oxygène. La première preuve d'une oxydation du méthane en conditions anaérobies vint par Hinrichs *et al.*, (1999). Ils ont montré qu'une archée cultivable de l'ordre des *Methanosarcinales* utilisait le méthane comme seule source de carbone. Ces archées capables de méthanotrophie en conditions anaérobies furent appelées ANME (ANAerobic MEthanotrophs). Par la suite, Boetius *et al.* (2000) furent les premiers à identifier un consortium entre des archées et des bactéries sulfato-réductrices (SRB), prouvant définitivement que le méthane peut être utilisé comme source de carbone en conditions anaérobies *via* une coopération entre les archées, activant le méthane, et les SRB, qui fournissent les électrons nécessaires à la transformation. Depuis plus de 15 ans, l'AOM est un processus très étudié, notamment dans les écosystèmes marins (Orphan *et al.*, 2001 ; Knittel *et al.*, 2003 ; Reitner *et al.*, 2005 ; Lloyd *et al.*, 2006) mais aussi dans les sédiments (Crowe *et al.*, 2011 ; Schubert *et al.*, 2011), les sols (Cadillo-Quiroz *et al.*, 2008 ; Zhang *et al.*, 2008) et les aquifères (Shimizu *et al.*, 2007).

D'autres voies ont été découvertes même si il demeure encore beaucoup d'inconnues dans ces processus et concernant les communautés qui les réalisent. A l'heure actuelle, 3 processus d'AOM ont été décrit impliquant une grande diversité de micro-organismes et de métabolismes.

- Couplage AOM / réduction des sulfates (SDMO) :

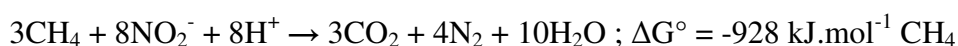
L'oxydation anaérobie du méthane couplée à la réduction des sulfates est un processus décrit essentiellement en milieu marin, avec des taux d'oxydation allant de 10 à 10 000 nmol.cm⁻³.jr⁻¹ en fonction de l'écosystème étudié (Knittel & Boetius, 2009). L'hypothèse d'un couplage entre les archées et les SRB a été émise par Hoehler *et al.* (1994) avant la mise en évidence du processus à la fin des années 1990 (Hinrichs *et al.*, 1999 ; Boetius *et al.*, 2000). L'AOM entre ces 2 communautés est réalisée selon l'équation suivante (Boetius *et al.*, 2000) :



Le consortium formé entre les 2 communautés a été mis en évidence par Boetius *et al.* (2000), les ANMEs appartenant aux *Methanosarcinales* et *Methanomicrobiales* (Knittel *et al.*, 2005) et les SRB à *Desulfosarcina* / *Desulfococcus* et *Desulfobulbus*.

- Couplage AOM / cycle de l'azote (NDMO) :

Le premier couplage démontré fut celui le l'AOM avec la dénitrification. Plusieurs études ont décrit la possibilité d'une oxydation anaérobie du méthane utilisant les nitrates (Valentine, 2000 ; Shima & Thauer, 2005) mais ce fut Raghoebarsing *et al.* (2006), qui démontrèrent le couplage entre les AOM et la réduction des nitrites. Ce couplage, encore mal connu, est réalisé selon l'équation suivante (Raghoebarsing *et al.*, 2006) :



Ce processus est réalisé par un groupe bactérien nouvellement décrit et appelé NC10 (Ettwig *et al.*, 2008), dont la principale espèce est une bactérie appelée *Candidatus Methyloirabilis oxyfera*. Son fonctionnement est complètement différent du SDMO car il n'utilise pas la même voie métabolique (pas de gène *mcrA*), il s'agit en effet d'une nouvelle voie de « dénitrification intra-aérobie » (Ettwig *et al.*, 2010). Celle ci utilise la production d'oxygène liée à la dismutation de 2 NO (Figure 7). Les principaux gènes de la méthanotrophie aérobie ont été identifiés chez *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* (Figure 8) mais l'intégralité de la voie et des gènes impliqués n'est pas encore clairement identifiée. Enfin, le groupe bactérien NC10 a été identifié dans plusieurs études sur des sédiments lacustres, ainsi on le retrouve dans le lac Biwa, le lac de Washington ou encore le lac Mystic (Ettwig *et al.*, 2009).

Au cours des différentes études sur le couplage entre AOM et le cycle de l'azote (Raghoebarsing *et al.*, 2006 ; Ettwig *et al.*, 2010), la présence d'une archée affiliée aux *Methanosarcinales* est décrite (AAA : AOM-associated Archaea). Toutefois, celle-ci disparaît après une longue incubation ce qui montre qu'elle n'est pas essentielle au processus entre la dénitrification et l'AOM (Ettwig *et al.*, 2010). Haroon *et al.* (2013) ont identifié cette archée, il s'agit d'une ANME-2d, appelée *Candidatus 'Methanoperedens nitroreducens'*, qui est capable de réaliser la transformation des nitrates en nitrites. Haroon *et al.* (2013) ont également identifié chez cette espèce l'ensemble des gènes nécessaires à la méthanogénèse inverse, processus inverse de la dernière étape de la méthanogénèse, qui permet d'oxyder le

méthane en CO_2 . Ainsi, *Candidatus 'Methanoperedens nitroreducens'* fournit les nitrites nécessaires à la division NC10 afin de réaliser l'oxydation du méthane couplée à la dénitrification, mais est aussi capable d'oxyder le méthane en conditions anaérobies (Figure 8).

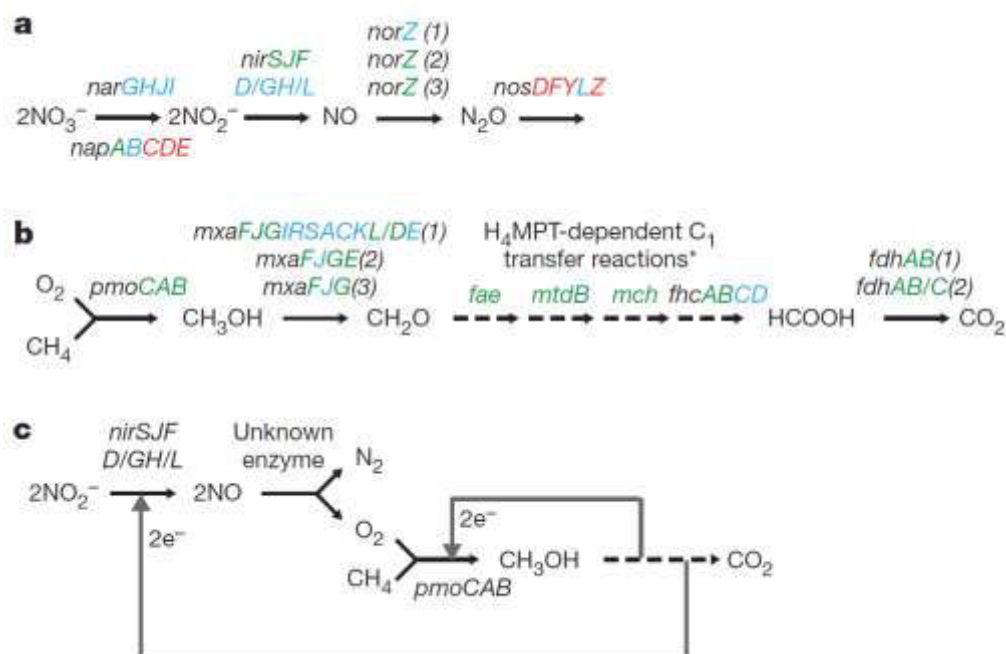


Figure 7 : Les différentes voies métaboliques chez *Candidatus 'Methyloirabilis oxyfera'* (Ettwig *et al.*, 2010), a) la dénitrification, b) la méthanotrophie et c) voie de l'oxydation anaérobie du méthane couplé à la dénitrification. Les gènes en rouge sont absents du génome alors que ceux en vert sont présents. Les gènes en bleu sont présents à la fois dans le génome et le protéome.

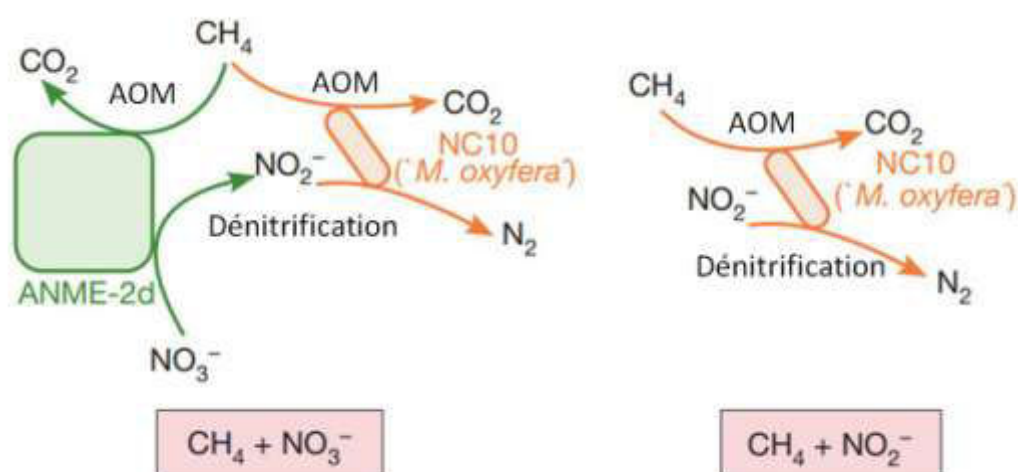
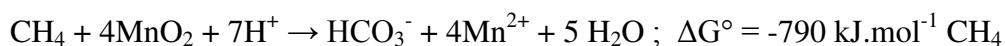


Figure 8 : Interaction entre les populations d'Archées ANME-2d et les bactéries NC10, modifiée d'après Haroon *et al.* (2013).

- Couplage AOM / cycle du fer et du manganèse :

Ce processus est le dernier, et le plus récemment décrit, des couplages permettant l'oxydation anaérobie du méthane. Il a été mis en évidence dans les sédiments marins de l'Eel River Basin en Californie par Beal *et al.* (2009). L'AOM avec le cycle du manganèse a été démontrée à partir d'un oxyde de manganèse : la birnessite (MnO_2 dans l'équation) et est réalisée selon l'équation suivante (1) :



L'AOM avec le cycle du fer a été démontrée à partir d'un hydrate de fer : la ferrihydrite ($\text{Fe}(\text{OH})_3$ dans l'équation) est réalisée selon l'équation suivante (2) :



D'après Beal *et al.* (2009), l'AOM couplée au manganèse a un taux de transformation plus élevé ($14 \mu\text{mol.an}^{-1}.\text{cm}^3$) qu'avec le fer ($6 \mu\text{mol.an}^{-1}.\text{cm}^3$). Toutefois ces 2 processus sont plus lents que la transformation avec les sulfates (SDMO, $52 \mu\text{mol.an}^{-1}.\text{cm}^3$), ceci s'expliquant par le fait que les oxydes de fer et de manganèse sont des solides, contrairement aux sulfates et sont donc moins accessibles aux micro-organismes. Les principaux microorganismes identifiés dans ce processus sont des archées non cultivables et regroupées dans un clade nommé « marine benthic group-D (MBG-D) ». Quelques ANME-1 et ANME-2 ont aussi été identifiés comme intervenants dans ces 2 processus. Toutefois, de nombreuses questions restent encore en suspens concernant ce couplage entre l'AOM et les cycles du fer et du manganèse.

III. Les acteurs du cycle du méthane

1. Outils et marqueurs moléculaires pour l'étude des communautés méthanogènes et méthanotrophes

L'étude des communautés microbiennes est longtemps passée par des techniques culturales, mais avec seulement 1% d'organismes cultivables ces techniques ne sont pas

adaptées à l'étude de la diversité. Elles s'avèrent néanmoins encore utiles pour l'obtention de lignées pures mais aussi pour la conservation de souches de références. Le développement des techniques moléculaires a permis l'émergence de méthodes permettant l'étude des communautés microbiennes, dont celles impliquées dans le cycle du méthane, en termes de diversité, d'abondance ou de structure (Figure 9).

Les techniques d'empreintes moléculaires ont l'avantage de donner un accès rapide à la structure des communautés pour un grand nombre d'échantillons et sont donc couramment utilisées pour analyser des dynamiques temporelles ou des variabilités spatiales *via* le ciblage de séquences nucléiques d'intérêt (ADNr 16S, ITS, gènes fonctionnels). Le gène codant l'ARNr 16S a été, dans un premier temps, utilisé pour l'étude des communautés méthanogènes et méthanotrophes dans les sédiments (Schwarz *et al.*, 2007 ; Auguet *et al.*, 2010 ; Song *et al.*, 2011 ; Bhattarai *et al.*, 2012 ; Borrel *et al.*, 2012). Puis, la description des processus liés à la méthanogénèse et à la méthanotrophie a mis en évidence les enzymes impliquées dans ces processus et, pour certains, les gènes codant ces enzymes se sont révélés être de bons marqueurs fonctionnels (cf paragraphes suivants). Les techniques d'empreintes moléculaires les plus couramment utilisées pour l'étude de ces communautés sont :

- La T-RFLP qui se base sur le polymorphisme de taille, après restriction enzymatique, de séquences du gène d'intérêt (ADNr 16S, gènes fonctionnels). Le choix de l'enzyme (ou des enzymes) de restriction conditionne directement la structure obtenue (Luna *et al.*, 2009).

- La DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) et la TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) se basent sur la séparation électrophorétique (gel d'acrylamide à gradient dénaturant) du polymorphisme du gène d'intérêt (Muyzer & Smalla, 1998). Cette technique présente des biais de reproductibilité des conditions de migrations électrophorétiques (Chan *et al.*, 2002 ; Surakasi *et al.*, 2010).

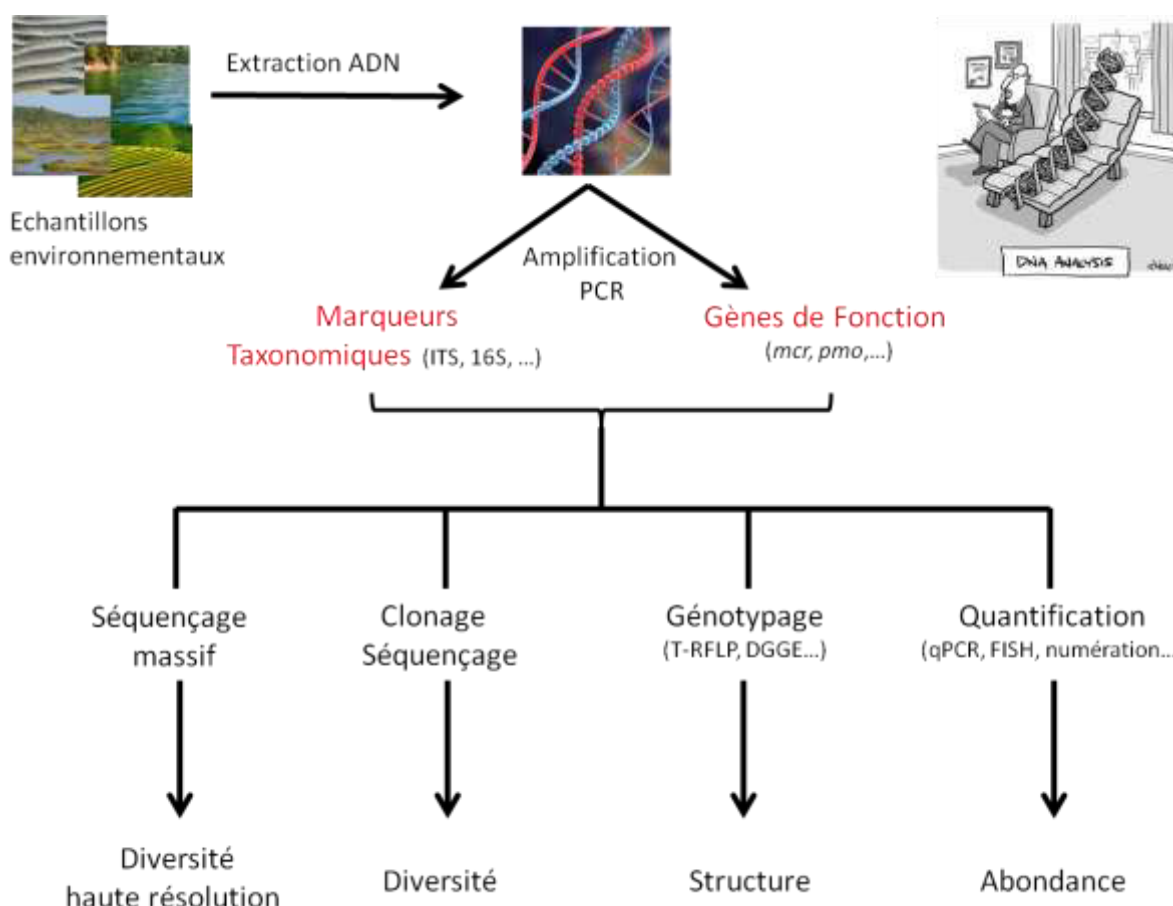


Figure 9 : Techniques de biologie moléculaire permettant l'étude des communautés méthanogènes et méthanotrophes

Afin de déterminer la diversité des communautés microbiennes le clonage – séquençage (Figure 9) est une approche très utilisée en écologie microbienne. La diversité des méthanogènes et des méthanotrophes est souvent appréhendée *via* l'utilisation du clonage-séquençage (Bussman *et al.*, 2004 ; Pester *et al.*, 2004 ; Chan *et al.*, 2005 ; Schwarz *et al.*, 2007 ; Angel *et al.*, 2011 ; Biderre-Petit *et al.*, 2011). Les techniques de séquençage massif permettent d'accéder à une grande majorité de la diversité, elles sont plutôt utilisées pour étudier la diversité « totale » bactérienne et archéenne dans lesquelles on peut identifier les communautés fonctionnelles telles que les méthanogènes et les méthanotrophes (He *et al.*, 2012).

L'étude de l'abondance des communautés microbiennes est réalisée *via* différentes méthodes (Figure 9) telles que :

- la PCR quantitative (Costello *et al.*, 2002 ; Rahalkar *et al.*, 2009) qui se base sur la quantification d'un marqueur fluorescent dont l'émission est proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction PCR.

- FISH (Rahalkar *et al.*, 2009) est une technique d'imagerie moléculaire qui est basée sur l'utilisation de sondes fluorescentes permettant la détection spécifique d'organismes

Enfin, pour l'étude des méthanotrophes, l'analyse des acides gras (PFLA) est utilisée (Costello *et al.*, 2002 ; Dumont *et al.*, 2006 ; Chowdhury & Dick, 2013) notamment car elle permet la discrimination des méthanotrophes de Types I et II (Le Bodelier *et al.*, 2009). Toutefois, elle peut aussi être utilisée pour l'estimation de leur abondance (Costello *et al.*, 2002).

2. Méthanogénèse et méthanotrophie : enzymes clés et marqueurs fonctionnels

i. Méthanogénèse : la méthyl coenzyme M réductase

Quelle que soit la voie métabolique utilisée au départ de la méthanogénèse, la dernière étape, c'est à dire la formation de méthane, est toujours la même. Il s'agit du couplage entre le méthyl coenzyme M et le coenzyme B pour former un hétérodisulfide et du méthane (Figure 4). Cette transformation est réalisée par une enzyme unique : la méthyl-coenzyme M réductase (MCR) qui est hautement conservée chez les méthanogènes. On distingue deux isoenzymes, MCR I et MCR II (Figure 10). L'isoenzyme MCR I est constituée de cinq sous unités (*mcrBCDGA*) et est présente chez l'ensemble des méthanogènes, alors que l'isoenzyme MCR II (*mrtBDGA*) est retrouvée uniquement chez certaines espèces de méthanogènes (Luton *et al.*, 2002). Par conséquent l'isoenzyme MCR I est caractéristique de l'ensemble archées-méthanogènes et, pour cela, elle constitue un marqueur fonctionnel pour la méthanogénèse (Luton *et al.*, 2002). En particulier, la sous-unité *alpha* du gène *mcr* est hautement conservée. De plus, les phylogénies du gène codant l'ARNr 16S et de ce gène (*mcrA*) sont congruentes (Springer *et al.*, 1995, Conrad, 2007, Figure 11). Ce gène, d'environ 1650 paires de bases, est aujourd'hui couramment utilisé comme marqueur fonctionnel pour l'étude des communautés méthanogènes dans l'environnement (Dhillon *et al.*, 2005 ; Orphan *et al.*, 2008 ; Conrad *et al.*, 2007 ; Biderre-Petit *et al.*, 2011 ; Barbier *et al.*, 2012 ; Zeleke *et al.*, 2013). Narihito &

Sekiguchi, (2011), ont synthétisé dans une revue l'ensemble des couples d'amorces existant et permettant d'utiliser ce gène comme marqueur pour l'ensemble des méthanogènes, de même que les sondes existantes afin de les détecter par fluorescence. Ces sondes peuvent être spécifiques de certaines espèces, genres, familles ou, pour certaines, de l'ensemble des méthanogènes (Narihiro & Sekiguchi, 2011).

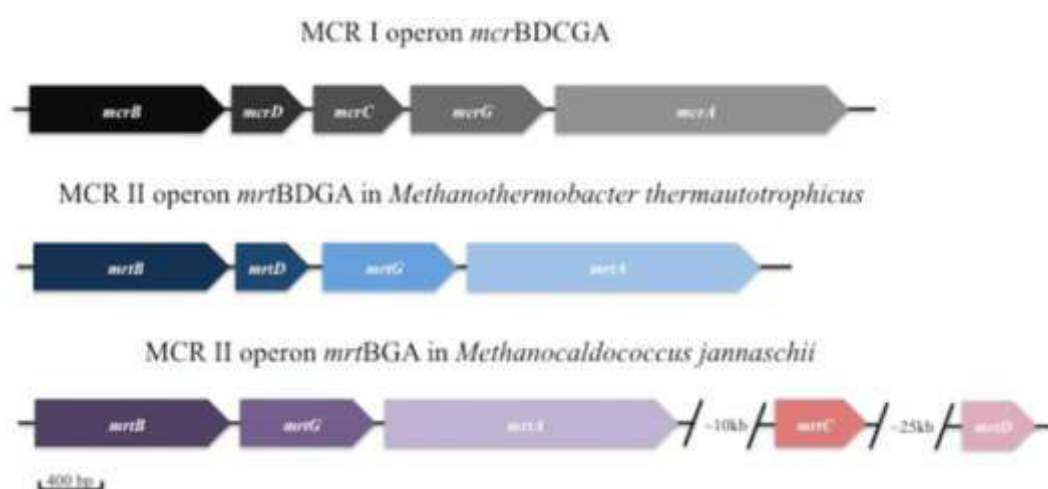


Figure 10 : Structure des opérons des isoenzymes MCR I et II de la méthyl coenzyme M réductase (Alvarado *et al.*, 2014)

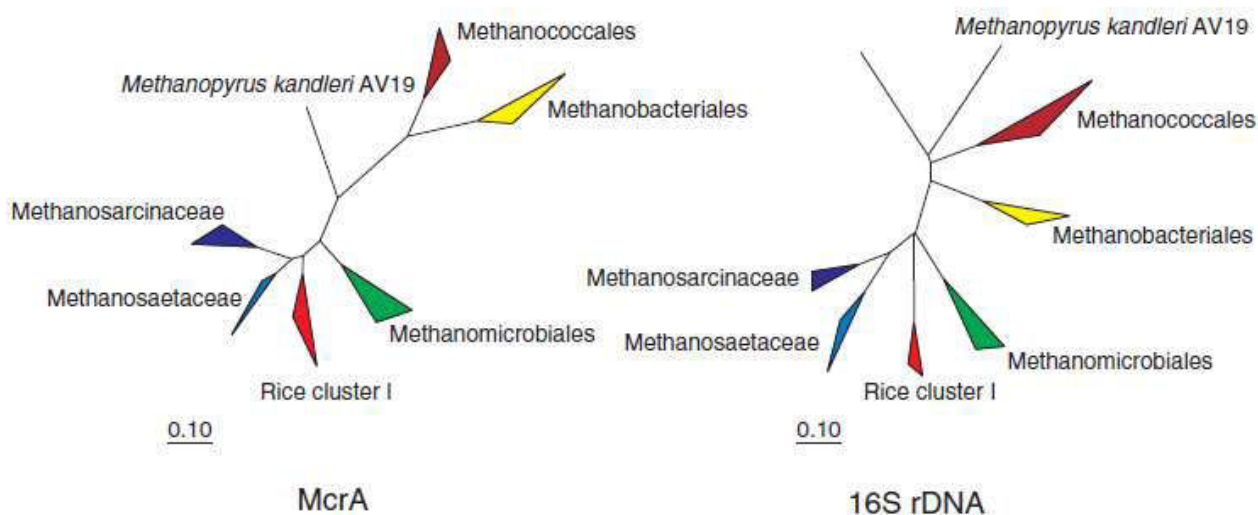


Figure 11 : Comparaison des arbres phylogénétiques des méthanogènes issus de la sous-unité *alpha* de la méthyl coenzyme M réductase (*mcrA*) et du gène codant l'ARNr 16S (Conrad, 2007). Le groupe Rice Cluster I est aujourd'hui représenté par l'ordre des *Methanocellales* (Sakai *et al.*, 2008).

ii. Méthanotrophie : la méthane mono oxygénase

Le premier gène utilisé pour la détection des méthanotrophes a été le gène codant la grande sous-unité de la méthanol déshydrogénase (*mxh*), mais elle n'est pas spécifique des méthanotrophes, par conséquent elle ne représentait pas un bon marqueur fonctionnel pour cette communauté. La première étape de la méthanotrophie est une étape clef puisqu'elle consiste en l'assimilation du méthane. De fait, l'enzyme qui réalise cette transformation est elle aussi une enzyme clef, il s'agit de la méthane mono-oxygénase (MMO). Cette enzyme est hautement conservée chez les méthanotrophes et existe sous 2 formes : une forme cytoplasmique soluble (sMMO, Figure 12) et une forme particulaire liée à la membrane (pMMO, Figure 12). La sMMO n'est pas présente chez tous les méthanotrophes contrairement à la forme particulaire qui est présente chez l'ensemble des méthanotrophes (sauf chez *Methylocella silvestris* qui n'a que la forme soluble).

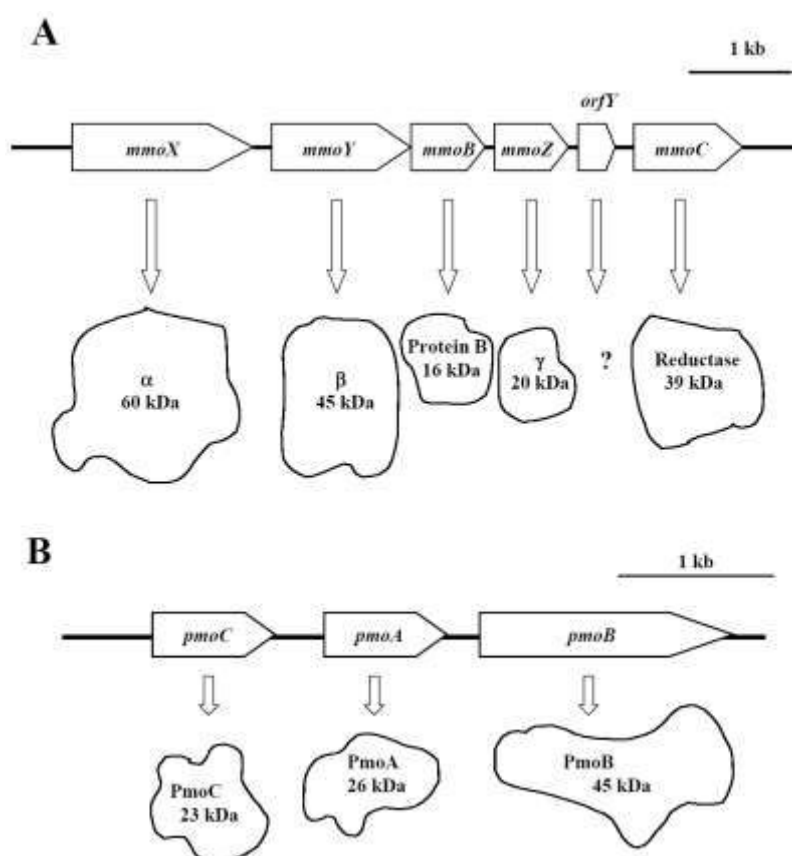


Figure 12 : Structure des opérons de la méthane mono oxygénase, (A) soluble, (B) particulaire (Murrel *et al.*, 2000).

Chez les méthanotrophes, l'opéron *pmoCAB* de la pMMO est présent en 2 copies identiques et une troisième copie de *pmoC* a été identifiée (Stolyar *et al.*, 1999). Cette forme particulière est très similaire au système utilisé par les bactéries nitrifiantes (ammonium mono oxygénase, *amo*) qui possèdent elles aussi 2 copies du gène *amoCAB* et une troisième de *amoC* (Murrell *et al.*, 2000). Ceci s'ajoutant à la similitude des molécules oxydées dans ces processus (CH_4 et NH_4^+). La forme particulière de la méthane mono oxygénase, de par son omniprésence chez les méthanotrophes et son haut état de conservation, de même que la congruence entre les phylogénies du gène *pmoA* et du gène codant pour l'ARNr 16S font que celui-ci est un bon marqueur phylogénétique pour les méthanotrophes (Bourne *et al.*, 2001, Semrau *et al.*, 2010, **Figure 13**). Ce gène, d'environ 810 paires de bases (Semrau *et al.*, 1995), est aujourd'hui souvent utilisé comme marqueur phylogénétique pour l'étude des communautés méthanotrophes dans l'environnement (Costello & Lidstrom, 1999 ; Pester *et al.*, 2004 ; Cébron *et al.*, 2007 ; Deutzmann *et al.*, 2011 ; Barbier *et al.*, 2012 ; Ma *et al.*, 2013). McDonald *et al.*, (2008), ont recensé une dizaine de couples d'amorces existant et permettant d'utiliser ce gène comme marqueur pour l'ensemble des méthanotrophes. Il existe aussi des amorces permettant de cibler spécifiquement les genres les plus souvent retrouvés chez les méthanotrophes de Type I (*Methylobacter*, *Methylococcus*, ...) et Type II (Costello & Lidstrom, 1999).

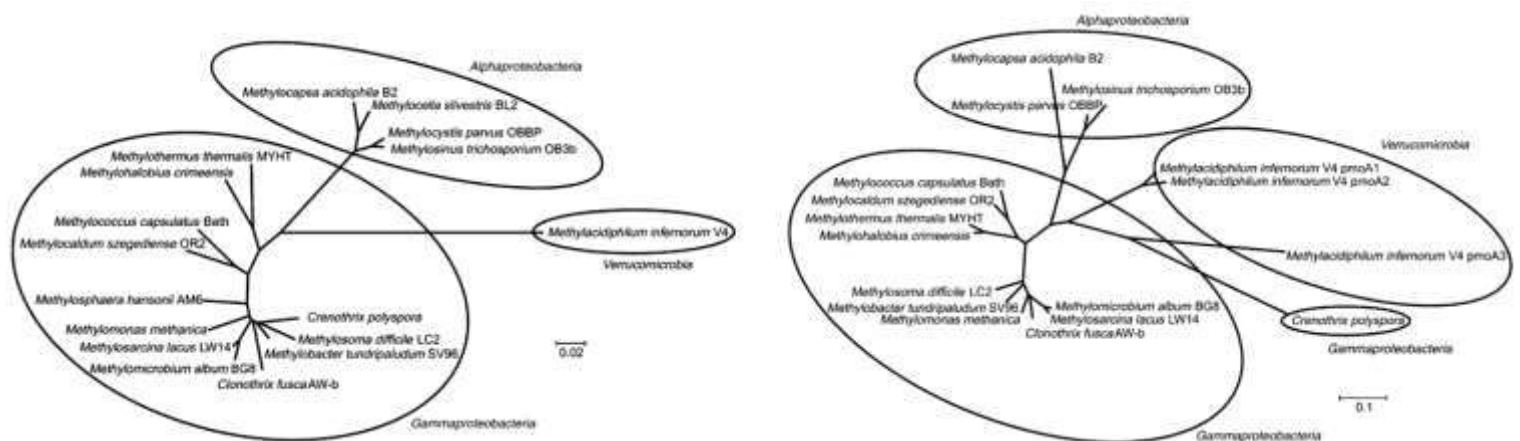


Figure 13 : Comparaison des arbres phylogénétiques des méthanotrophes issus de l'ADNr 16S (gauche) et de la sous unité alpha de la méthane mono oxygénase particulaire (droite, *pmoA*) (Semrau *et al.*, 2010).

3. Les méthanogènes : producteurs de méthane

i. Classification

Les méthanogènes sont un groupe paraphylétique exclusivement archéen, affiliés aux *Euryarchaeota*. Actuellement, on connaît 34 genres de méthanogènes répartis en 6 ordres : *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanocellales* et *Methanopyrales* (Figure 11). L'ordre des *Methanocellales* était auparavant appelé Rice Cluster I (RC I), mais suite à l'isolement de la souche *Methanocella paludicola* SANAÉ, par Sakai *et al.* (2008), ce cluster fut renommé car ce genre a été identifié dans différents écosystèmes. Les méthanogènes sont le plus souvent classés en fonction du substrat qu'ils utilisent (cf partie II.1-ii), ainsi on va retrouver les méthanogènes hydrogénotrophes (ex : *Methanobacteriales*), acétotrophes (ex : *Methanosarcinales*) et les méthylotrophes (ex : *Methanosphaerula*, *Methanobacterium*). Toutefois, certaines espèces comme *Methanosarcina* sont capables d'utiliser différents substrats (acétate et CO_2/H_2) et vont donc être classées à la fois comme acétotrophes et hydrogénotrophes. L'ordre des *Methanomicrobiales* est celui pour lequel on compte le plus de genres connus à l'heure actuelle (12 genres, Figure 14) avec les *Methanosarcinales* (10 genres, Figure 14). Les *Methanobacteriales* et les *Methanococcales* comptent moins de genres, avec 5 genres décrits pour le premier et 4 pour le second (Figure 14). Enfin les *Methanocellales* comptent 2 familles, les *Methanocellaceae* et les *Methanoflorentaceae* (Mondav *et al.*, 2014) et les *Methanopyrales* sont représentés uniquement par *Methanopyrus kandleri* (Figure 14).

Il existe 2 clades qui ont été proposés pour être intégrés aux méthanogènes, ils sont basés sur des séquences issues de l'environnement :

- Clade Mx (Mihajlovski *et al.*, 2010) : basé sur des séquences issues de systèmes digestifs et de sols. Les séquences de ce clade possèdent le gène *mcrA* mais il est possible qu'il ne soit pas impliqué dans la méthanogénèse mais dans l'oxydation anaérobie du méthane (ANME-1)
- Clade MSBL1 (Auguet *et al.*, 2010) : basé sur des séquences issues de milieux hypersalins. Son activité de méthanogénèse n'a pas été prouvée directement, il a seulement été découvert dans des milieux à forte concentration en méthane.

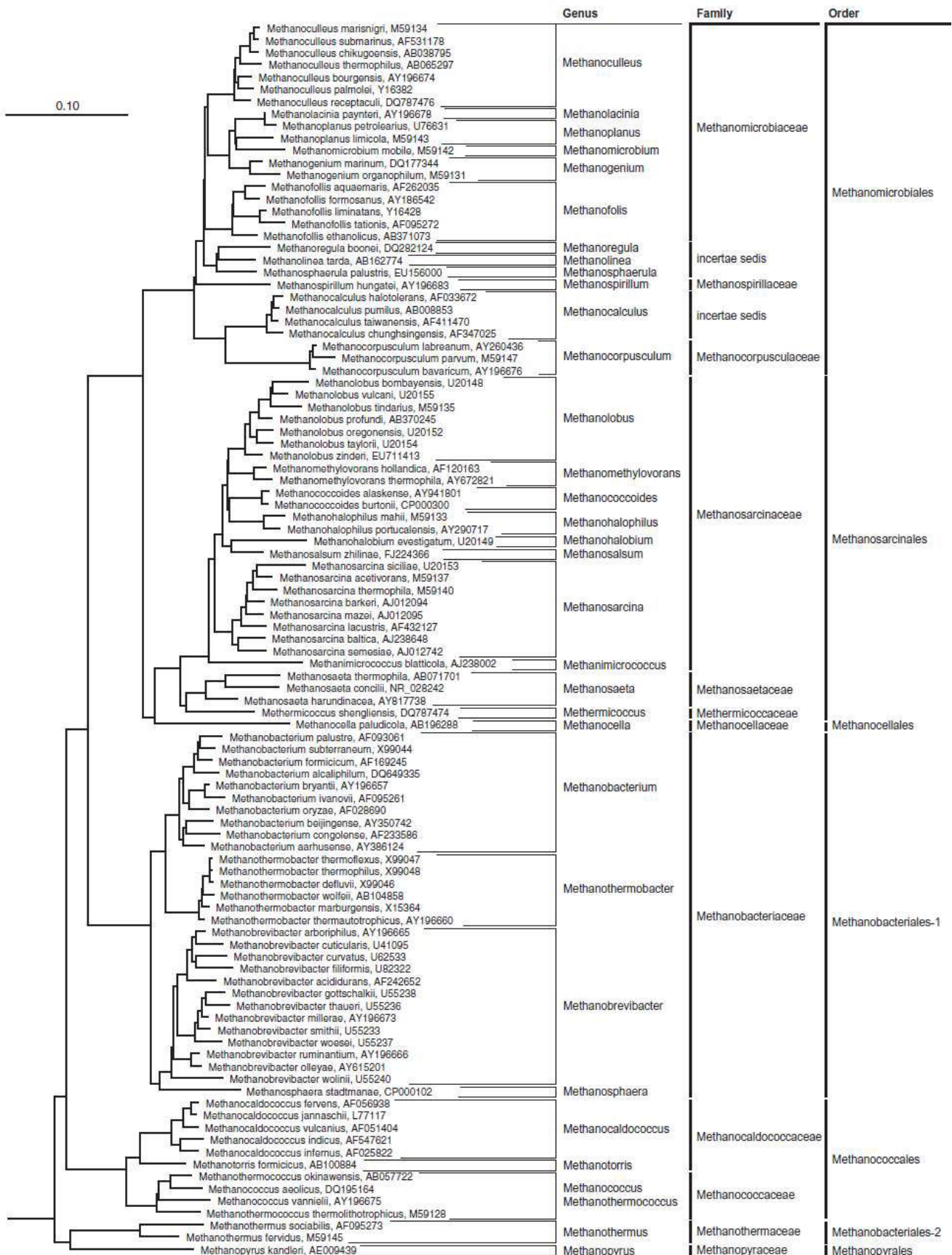


Figure 14 : Phylogénie et taxonomie des méthanogènes d'après Narihiro & Sekiguchi., (2011). L'arbre a été construit à partir de la méthode de Neighbour-Joining d'après les séquences de l'ADNr 16S. La famille des *Methanoflorentaceae*, nouvellement décrite, compte actuellement une seule espèce *Candidatus 'Methanoflorens stordalenmirensis'* est à ajouter dans l'ordre des *Methanocellales* (Mondav et al., 2014).

ii. Physiologie

Les méthanogènes possèdent des systèmes hautement spécialisés pour générer l'énergie nécessaire à leur croissance et à leur fonctionnement *via* le processus de méthanogénèse (cf III.1.i) car ils ont des capacités limitées de métabolisation des composés carbonés complexes. Les descriptions sont souvent basées sur des approches culturales, or très peu sont cultivables. Les principales caractéristiques des différents ordres de méthanogènes sont résumées dans le [Tableau 1](#).

Chacun des ordres de méthanogènes possède des caractéristiques spécifiques, ainsi les *Methanosarcinales* sont les seules à pouvoir utiliser l'acétate comme substrat. Chez les *Methanomicrobiales*, on retrouve quelques espèces mobiles telles que *Methanospirillum hungatei* et *Methanoculleus marisnigri* qui sont pourvues de flagelles. Quant aux *Methanococcales*, ils sont tous pourvus de flagelles. L'espèce *Methanococcus maripaludis* est capable de fixer l'azote car elle possède l'opéron *nif* (nitrogenase) qui lui permet de transformer le diazote (N_2) en ammoniac (NH_3). Chez les *Methanobacteriales* on retrouve des genres méso-thermophiles (*Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*) et un genre thermophile, *Methanothermus*, dont l'optimum de croissance est compris entre 83 et 88°C. Enfin, les *Methanopyrales* constituent un ordre un peu particulier car une seule espèce a été décrite à ce jour, *Methanopyrus kandleri* (Kurr *et al.*, 1991). Cette espèce a été découverte à 2 000 m de profondeur sur les parois d'une cheminée hydrothermale. Elle est strictement chemolitho-autotrophe, hydrogénotrophe (H_2 , CO_2) et hyperthermophile (84 – 110°C) avec un optimum de croissance à 98°C.

Les études sur les méthanogènes étant de plus en plus nombreuses du fait de leurs implications dans la production de gaz à effet de serre, les connaissances sur ces communautés sont de plus en plus importantes. La diversité et la physiologie de cette communauté est relativement bien connue, toutefois de nouveaux genres (Mondav *et al.*, 2014) et de nouvelles espèces (Schirmack *et al.*, 2014) sont encore découvertes et il en reste probablement encore à découvrir.

Tableau 1 : Description des principales caractéristiques chez les *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, *Methanobacteriales* et *Methanococcales* (Garcia *et al.*, 2006 ; Bonin & Boone, 2006 ; Kendall & Boone, 2006).

Caractéristiques	<i>Methanomicrobiales</i>	<i>Methanosarcinales</i>	<i>Methanobacteriales</i>	<i>Methanococcales</i>
Morphologie	Petits bâtonnets (plats, incurvés), coques irrégulières	Coques irrégulières (parfois en agrégat), bâtonnets	Bâtonnets courts, coques	Coques irrégulières
Mol % G+C	38 - 61	36 - 54	26 - 61	30 - 33
Substrats	H ₂ , CO ₂ , formate, alcools	H ₂ , CO ₂ , acetate, méthylamines	H ₂ , CO ₂ , formate, alcools	H ₂ , CO ₂ , formate
Températures	0°C – 60°C	2°C – 70°C	20°C – 97°C	18°C – 94°C
pH	6,1 - 8	6,5 - 9	5 - 9	6,5 - 8
Familles principales	<i>Methanocorpusculaceae</i> <i>Methanomicrobiaceae</i> <i>Methanoregulaceae</i> <i>Methanospirillaceae</i>	<i>Methanosaetaceae</i> <i>Methanosarcinaceae</i> <i>Methermicoccaceae</i>	<i>Methanobacteriaceae</i> <i>Methanothermaceae</i>	<i>Methanococcaceae</i> <i>Methanocaldococcaceae</i>

iii. Ecologie

Les méthanogènes jouent un rôle écologique majeur dans l'environnement, notamment par le recyclage des produits issus de la fermentation et du dihydrogène. Ils sont ubiquistes dans les environnements anoxiques où les accepteurs d'électrons sont limités (O₂, NO₃⁻, Fe³⁺, SO₄²⁻). Ils ont été décrits dans de nombreux environnements tels que les zones humides (Juottonen *et al.*, 2005 ; Cadillo-Quiroz *et al.*, 2006 ; Akiyama *et al.*, 2011), les sédiments (Conrad *et al.*, 2010 ; Biderre-Petit *et al.*, 2011 ; Nolla-Ardevol *et al.*, 2012 ; Zeleke *et al.*, 2013), les rizières (Conrad *et al.*, 2007 ; Ma & Lu, 2011), les sources géothermales (Dhillon *et al.*, 2005), le permafrost (Barbier *et al.*, 2012) et les tractus digestifs d'animaux (Frey *et al.*, 2009). Les méthanogènes sont dépendants des premières étapes de la dégradation de la matière organique dans l'environnement qui mettent à leur disposition les substrats nécessaires à la méthanogénèse. Ainsi on retrouve 3 grands écosystèmes pour les méthanogènes dans l'environnement (Garcia *et al.*, 2000), à savoir :

- les environnements anoxiques : la matière organique est dégradée, la répartition des méthanogènes se fait en fonction du substrat et l'on trouvera dans ces environnements à la fois des méthanogènes acétotrophes et des hydrogénotrophes.
- les tractus digestifs : le processus de minéralisation est incomplet et de nombreux produits intermédiaires sont formés mais sont absorbés *via* les voies nutritives, par conséquent seuls le CO₂ et H₂ sont disponibles pour les méthanogènes hydrogénotrophes.

- les sources géothermales : la matière organique est absente et les méthanogènes utilisent uniquement l'hydrogène formé par les processus géochimiques. Par conséquent, seuls les méthanogènes hydrogénotrophes sont présents.

La distribution des méthanogènes dans l'environnement est dépendante de leur adaptation à différents paramètres tels que la température, le pH, l'oxygène ou la salinité. Toutefois la gamme d'adaptation de ces paramètres est assez vaste puisque l'on retrouve des méthanogènes entre 4 et 110°C, avec 11 genres thermophiles et 3 hyperthermophiles (Garcia *et al.*, 2000). Les méthanogènes présentent également une très vaste gamme de tolérance à la salinité avec des genres halophiles tels que *Methanogenium*, *Methanococcus* et *Methanocalculus* (Garcia *et al.*, 2000). A l'inverse, leur gamme de tolérance pour le pH est plutôt restreinte autour de la neutralité (pH 7). On retrouve cependant des méthanogènes dans des gammes allant de pH 5 à pH 9. Pour ce qui est de la tolérance à l'oxygène, pendant longtemps les méthanogènes ont été considérés comme strictement anaérobies et sensibles à de très faibles niveaux d'oxygène (< 10 ppm, Garcia *et al.*, 2000), l'oxygène causant une dissociation irréversible du complexe enzymatique F₄₂₀ qui permet la dernière étape de la méthanogénèse. Des études récentes tendent à montrer que certains méthanogènes seraient capables de vivre dans des conditions oxygénées et de réaliser la méthanogénèse (Angel *et al.*, 2011, Grossart *et al.*, 2011, Tang *et al.*, 2014). Angel *et al.* (2011) ont montré la présence de méthanogènes (*Methanocella* et *Methanosarcina*) dans des sols désertiques oxygénés. Ils ont également démontré que ces 2 genres, en plus de tolérer de longues périodes de dessiccation dans un sol désertique, toléraient l'oxygène et étaient capables de reprendre une activité de méthanogénèse après quelques jours d'inondation du sol. *Methanocella* et *Methanosarcina* ont la capacité de transcrire des gènes responsables de la détoxification de molécules réactives à l'oxygène (ROS, Reactive Oxygen Species), leur permettant d'éviter les dommages cellulaires, membranaires et protéiques que causent ces molécules. *Methanosarcina* est une espèce souvent retrouvée dans les écosystèmes lacustres. Les travaux de Angel *et al.* (2011) pourraient laisser penser que cette espèce peut être présente dans des compartiments oxygénés lacustres tel que l'interface eau-sédiment ou la colonne d'eau.

Les méthanogènes sont aussi sensibles à différentes substances telles que l'éthylène et l'acétylène, et leur croissance, de même que la production de méthane, est inhibée par le fluorométhane (CH₃F, Garcia *et al.*, 2000). Des interactions entre des méthanogènes et d'autres communautés microbiennes ont été décrites, notamment des interactions syntrophiques avec des bactéries permettant un transfert d'hydrogène et l'oxydation de

composés tels que des alcools (*Pelobacter*), des acides gras (*Syntrophobacter*, *Syntrophomonas*, *Clostridium*), des acides benzoïques (*Syntrophus*), du fructose (*Syntrophococcus*) ou de l'acide glycolique (*Syntrophobotulus*). La consommation du dihydrogène par les méthanogènes permet la croissance de bactéries syntrophiques et l'oxydation des différents substrats (Garcia *et al.*, 2000).

4. Les méthanotrophes : consommateurs de méthane

i. Classification

Les méthanotrophes aérobies ont été identifiés au début du XX^{ème} siècle (Semrau *et al.*, 2010). Ils forment un groupe polyphylétique affilié aux bactéries du fait de la présence des gènes de la méthanotrophie, en particulier *pmo*, chez *Methylacidiphilum* et *Crenothrix*. Ceci ne serait pas dû à un transfert latéral de ces gènes mais plutôt à une divergence de ces groupes à partir des méthanotrophes il y a très longtemps (Semrau *et al.*, 2010). La divergence entre les séquences codant pour *pmoA* suggère que d'autres méthanotrophes peuvent exister que ce soit au sein de phylums déjà connus (*Proteobacteria* et *Verrucomicrobia*) ou non (Semrau *et al.*, 2010). A l'heure actuelle, il existe 4 grandes familles de bactéries méthanotrophes (Figure 15) : *Methylococcaceae* (gamma-Protéobactéries, aussi appelé type I), *Methylocystaceae* (alpha-Protéobactéries, aussi appelé type II), *Beijerinckiaceae* (alpha-Protéobactéries) et *Methylacidiphilaceae* (*Verrucomicrobia*). La famille des *Verrucomicrobia* a été la dernière décrite (Dunfield *et al.*, 2007) et un nouveau genre a été récemment découvert : *Methylacidimicrobium* dont 3 espèces ont été décrites pour le moment (van Teeseling *et al.*, 2014). Parmi les bactéries méthanotrophes, on trouve une espèce anaérobie affiliée à la division NC10 (Ettwig *et al.*, 2008), *Candidatus 'Methylomirabilis oxyfera'*.

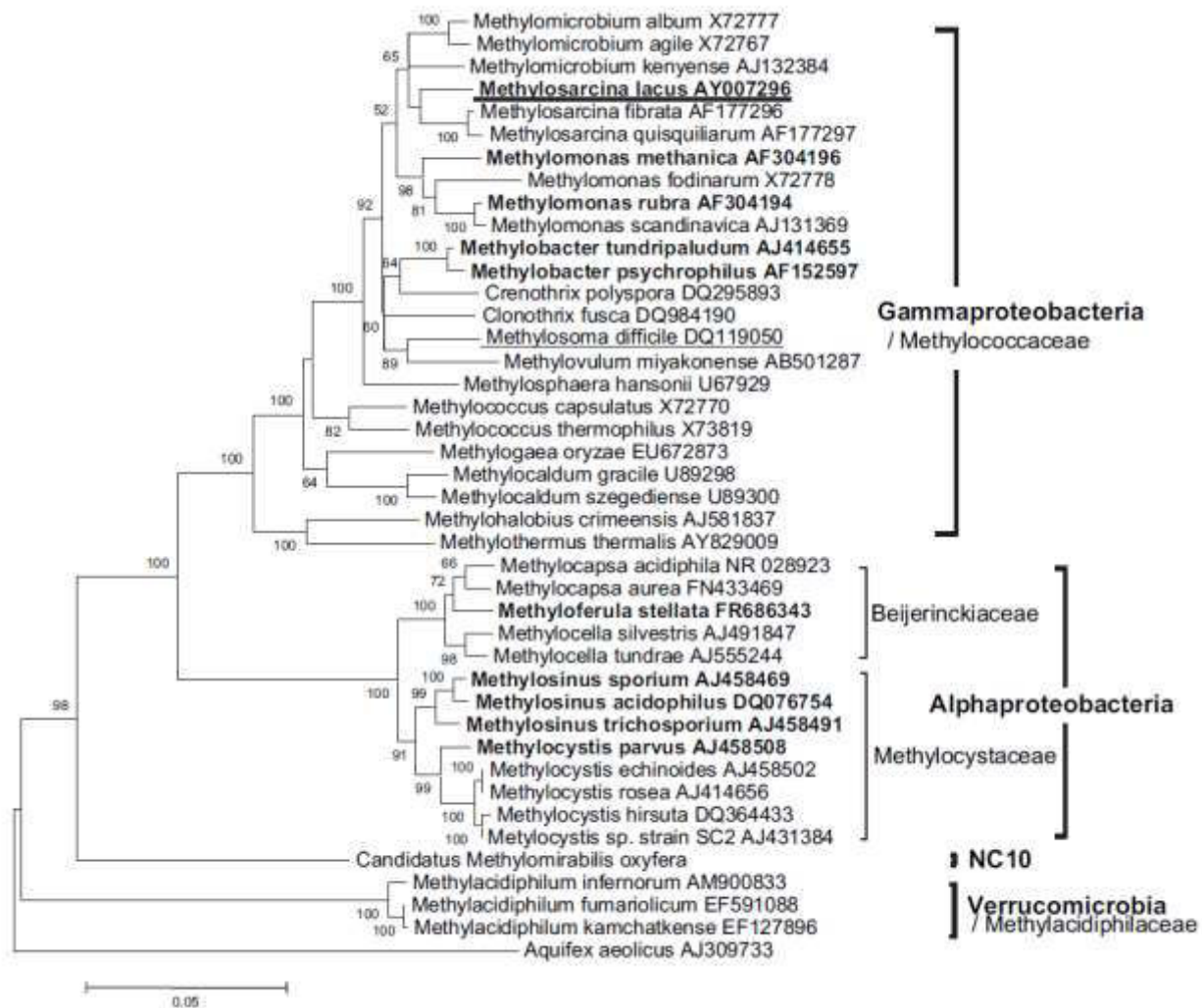


Figure 15 : Arbre phylogénétique des méthanotrophes aérobies et de la division NC10 (méthanotrophes anaérobies) d'après les séquences de l'ADNr 16S (Borrel *et al.*, 2011). L'arbre a été construit à partir de la méthode de Neighbour-Joining avec des valeurs de bootstrap (1000 répliqués). Le genre *Methylacidimicrobium*, nouvellement décrit (van Teeseling *et al.*, 2014), est à inclure dans la famille des *Verrucomicrobia*.

Les méthanotrophes les plus couramment décrits sont les Types I et II (Hanson & Hanson, 1996). Les méthanotrophes de Type I utilisent la voie de la RuMP alors que les méthanotrophes de Type II utilisent la voie de la sérine (cf partie II.2.ii, Figure 7). Un troisième type, appelé X, a été créé afin de faire un compromis pour des espèces ayant des caractéristiques des types I et II. Le Type X a été depuis reclassé dans la famille des *Methylococcaceae* (Bodrossy *et al.*, 2003) avec l'appellation Type Ib, les autres membres de cette famille étant appelés Type Ia. Parmi les méthanotrophes de Type Ib on retrouve des genres tels que *Methylococcus*, *Methylocaldum*, *Methylohalobius* et *Methylothermus* qui sont

thermotolérants voire thermophiles pour le genre *Methylococcus*. Enfin, *Crenothrix polyspora* et *Clonothrix fusca* ont été identifiés récemment comme étant des méthanotrophes facultatifs et sont phylogénétiquement proches des méthanotrophes de type I (Stoecker *et al.*, 2006 ; Vigliotta *et al.*, 2007). Malgré le nombre important (comparativement aux méthanogènes) d'espèces cultivables parmi les méthanotrophes, qui permet d'analyser plus facilement leurs caractéristiques physiologiques, morphologiques, écologiques et leurs adaptations spécifiques, ces communautés sont encore mal cernées et leur classification est en constante évolution.

ii. Physiologie

Les méthanotrophes sont des bactéries méthylotrophes (utilisation de composés en C1) spécialisées dans l'utilisation du méthane comme source de carbone et d'énergie. Cette spécialisation les oblige à avoir les enzymes capables de cette transformation, en particulier la méthane mono-oxygénase (cf partie III.1.ii). Toutefois les différents clades de méthanotrophes se différencient en termes de voies métaboliques, de structure, de composition mais aussi en terme de préférences écologiques (ex : pH, température...). Les grandes caractéristiques des différents types de méthanotrophes sont résumées dans le [Tableau 2](#).

Les méthanotrophes ont été détectés au sein d'une très large gamme de pH et de températures, toutefois certains sont plus spécialisés que d'autres. C'est le cas, par exemple, de *Methyloacidiphilum fumariolicum* dont le pH optimum est à 2 mais peut supporter des pH jusqu'à 0,8. De même, *Methyloacidiphilum infernorum* a un optimum de température de 60°C. Nous disposons de peu de connaissances sur les méthanotrophes appartenant à la famille des *Verrucomicrobia* dont les espèces décrites, pour le moment, sont issues de régions géothermales et volcaniques (Italie, Russie et Nouvelle Zélande). Il est donc probable que de nouvelles espèces ou genres restent à découvrir au sein de cette famille et probablement aussi au sein des autres familles de méthanotrophes.

iii. Ecologie

L'étude de la structure, de la diversité, de l'activité et de l'écologie des méthanotrophes est importante pour la compréhension de la régulation des émissions de

méthane dans l'atmosphère. La capacité d'oxydation du méthane par ces communautés a été étudiée dans divers écosystèmes tels les sols (Bourne *et al.*, 2001 ; Degelman *et al.*, 2010 ; Semrau *et al.*, 2010), les zones humides (Freitag *et al.*, 2010 ; Akiyama *et al.*, 2011 ; Yun *et al.*, 2012), les rizières (Conrad, 2007 ; Krause *et al.*, 2010 ; Ma *et al.*, 2013), les lacs (Auman *et al.*, 2000 ; Deutzman *et al.*, 2011 ; Biderre-Petit *et al.*, 2011), et les écosystèmes marins (Lösekann *et al.*, 2007 ; Tavormina *et al.*, 2010 ; Hirayama *et al.*, 2013).

Si le processus de méthanotrophie est directement impacté par la disponibilité du méthane, tous les méthanotrophes n'ont pas la même capacité d'oxydation du méthane. Certains méthanotrophes ont une haute affinité pour le méthane et sont capables de réaliser la méthanotrophie à de faibles concentrations en méthane (< 2 ppm). Ils seraient responsables de l'oxydation d'environ 10% du méthane produit (Chowdhury & Dick, 2013). A l'inverse, d'autres méthanotrophes ont une faible affinité pour cette molécule et vont avoir besoin de fortes concentrations en méthane pour pouvoir l'oxyder (> 40 ppm). Ces méthanotrophes domineraient les environnements anoxiques tels les rizières, les sédiments ou les tourbières (Chowdhury & Dick., 2013). La disponibilité de l'oxygène est également importante et il a été démontré que les méthanotrophes sont capables de résister à l'absence d'oxygène et de reprendre des activités de méthanotrophie après plusieurs semaines de privation (Roslev & King, 1996). Une étude de Amaral & Knowles, (1995) a conclu que les méthanotrophes de Type II sont dominants dans les écosystèmes où la concentration en oxygène est faible et celle de méthane élevée, et inversement pour les méthanotrophes de Type I. A ceci s'ajoute une étude montrant la prédominance des méthanotrophes de Type II lorsque les concentrations en méthane augmentent (Macalady *et al.*, 2002). Toutefois, en milieu naturel, les 2 types de méthanotrophes sont présents et actifs. Il semble que les méthanotrophes de Type I répondent plus rapidement aux changements environnementaux, du fait d'une croissance rapide (stratégie r), et sont favorisés dans des environnements hétérogènes, contrairement aux méthanotrophes de Type II dont les populations sont plus stables (stratégie k, Semrau *et al.*, 2010 ; Ma *et al.*, 2013).

Tableau 2 : Description des caractéristiques physiologiques des bactéries méthanotrophes d'après Semrau *et al.* (2010) ; Bowman, (2014) et van Teeseling *et al.* (2014).

Caractéristiques	Type Ia	Type Ib	Type Ic	Type II	Type II	Verrucomicrobia	
Affiliation		Gammaprotéobactérie		Alphaprotéobactérie		Verrucomicrobia	
Familles		<i>Methylococcaceae</i>		<i>Methylocystaceae</i>	<i>Beijerinckiaceae</i>	<i>Methylacidiphilaceae</i>	
Genres		<i>Methylomonas</i>					
		<i>Methylobacter</i>					
		<i>Methylomicrobium</i>					
	<i>Methylococcus</i>	<i>Methylosarcina</i>	<i>Methylohalobius</i>	<i>Methylocystis</i>	<i>Methylocella</i>	<i>Methylacidiphilum</i>	<i>Methylacidimicrobium</i>
	<i>Methylocaldum</i>	<i>Methylovulum</i>	<i>Methylothermus</i>	<i>Methylosinus</i>	<i>Methylocapsa</i>		
	<i>Methylogaea</i>	<i>Methylomarinum</i>			<i>Methyloferula</i>		
		<i>Methylosoma</i>					
		<i>Methylosphaera</i>					
		<i>Crenothrix</i>					
Type de MMO		pMMO (sMMO rare)		pMMO et sMMO	pMMO ou sMMO	pMMO	
Voies métaboliques		RuMP		Sérine		Cycle de Calvin	
Acides gras	C _{16:0} , C _{16:1}	C _{14:0} , C _{16:0} , C _{16:1}	C _{16:0} , C _{18:1}	C _{18:1}		C _{18:0} , C _{15:0} anteiso, C _{14:0} iso	NA
Température	Mésophiles - Thermophiles	Psychrophiles - Mésophiles	Mésophiles - Thermophiles	Mésophiles		Thermophiles	Mésophiles
pH	Neutre	Neutre - Alcalin	Neutre	Neutre - Alcalin	Acide	Acide	
Methylotrophie	+	+	+	+	+/-	+	
Fixation de l'azote	+/-	+/-	-	+/-	+	+/-	NA
Ratio G+C (% mol)	56 - 66	43 - 60	54 - 62	60 - 67	60 - 63	40 - 46	60 - 64

Abréviations : pMMO, méthane mono oxygénase particulaire ; sMMO, méthane mono oxygénase soluble ; RuMP, Ribulose mono-phosphate ; NA, pas de données.

D'autres paramètres environnementaux influencent la structure de ces communautés, de leurs activités et de l'oxydation du méthane dans les lacs : la température qui semble être un facteur impactant la structure des méthanotrophes, favorisant les Type I en dessous de 12°C et les Type II au dessus (Semrau *et al.*, 2010 ; Borrel *et al.*, 2012). De nombreuses études ont tenté de comprendre l'influence de l'azote sur les méthanotrophes et la méthanotrophie. Certaines ont montré que l'augmentation d'ammonium inhibait la consommation de méthane (Bédard & Knowles, 1989 ; Bosse *et al.*, 1993) et d'autres l'inverse (Bodelier & Laanbroek 2004). L'azote est un paramètre qui a souvent été étudié, mais ses effets sur la méthanotrophie et sur les méthanotrophes restent peu clairs et difficiles à expliquer actuellement. Un dernier paramètre est le broutage par des protozoaires tels que des amibes, des ciliés ou des flagellés (Muraze & Frenzel, 2007) influant sur les méthanotrophes. Les protozoaires régulent la structure des communautés, leur taille et leurs activités (Murase & Frenzel, 2008) ce qui impacte par la suite la capacité des méthanotrophes à oxyder le méthane. L'importance de ce facteur sur la structure de la communauté (broutage sélectif, Jones & Grey, 2011) et la méthanotrophie n'est pas encore clairement définie.

5. Les ANME : méthanotrophes anaérobies

i. Identification des ANME

La mise en évidence de l'AOM avec la réduction des sulfates a permis de découvrir que des archées, toutes issues des *Euryarchaeota*, réalisent ces processus. Jusqu'alors seules des bactéries ont été identifiées comme méthanotrophes. Les ANME constituent 3 groupes, nommés ANME -1, -2 (a, b, c, d) et -3 qui sont relativement proches des *Methanosarcinales* et *Methanomicrobiales*. Les ANME ont été détectés dans différents environnements : le milieu marin, où ils ont été découverts, (Hinrichs *et al.*, 1999 ; Orphan *et al.*, 2001 ; Hallam *et al.*, 2004), les écosystèmes lacustres (Jiang *et al.*, 2008 ; Schubert *et al.*, 2011), les aquifères (Gihring *et al.*, 2006 ; Shimizu *et al.*, 2007), les sols (Steinberg & Regan, 2008 ; Zhang *et al.*, 2008) ou encore les traitements d'eaux usées (Steinberg & Regan, 2008). Les ANME sont présents dans le milieu naturel soit à l'état de cellules libres (Figure 16a, h) soit en consortium avec d'autres micro-organismes (Figure 16). Les ANME-1 et -2 forment le plus souvent des consortiums avec *Desulfosarcina* et *Desulfococcus* (SRB, Deltaprotéobactéries) alors que les

ANME-3 s'associent avec *Desulfobulbus* (Knittel & Boetius, 2009). Toutefois des associations entre les ANME – 2c / *Desulfobulbus* ont été observées, de même que des consortiums entre ANME – 2c et des Alphaprotéobactéries (*Sphingomonas spp.*) et des Betaprotéobactéries (*Burkholderia*) (Knittel & Boetius, 2009).

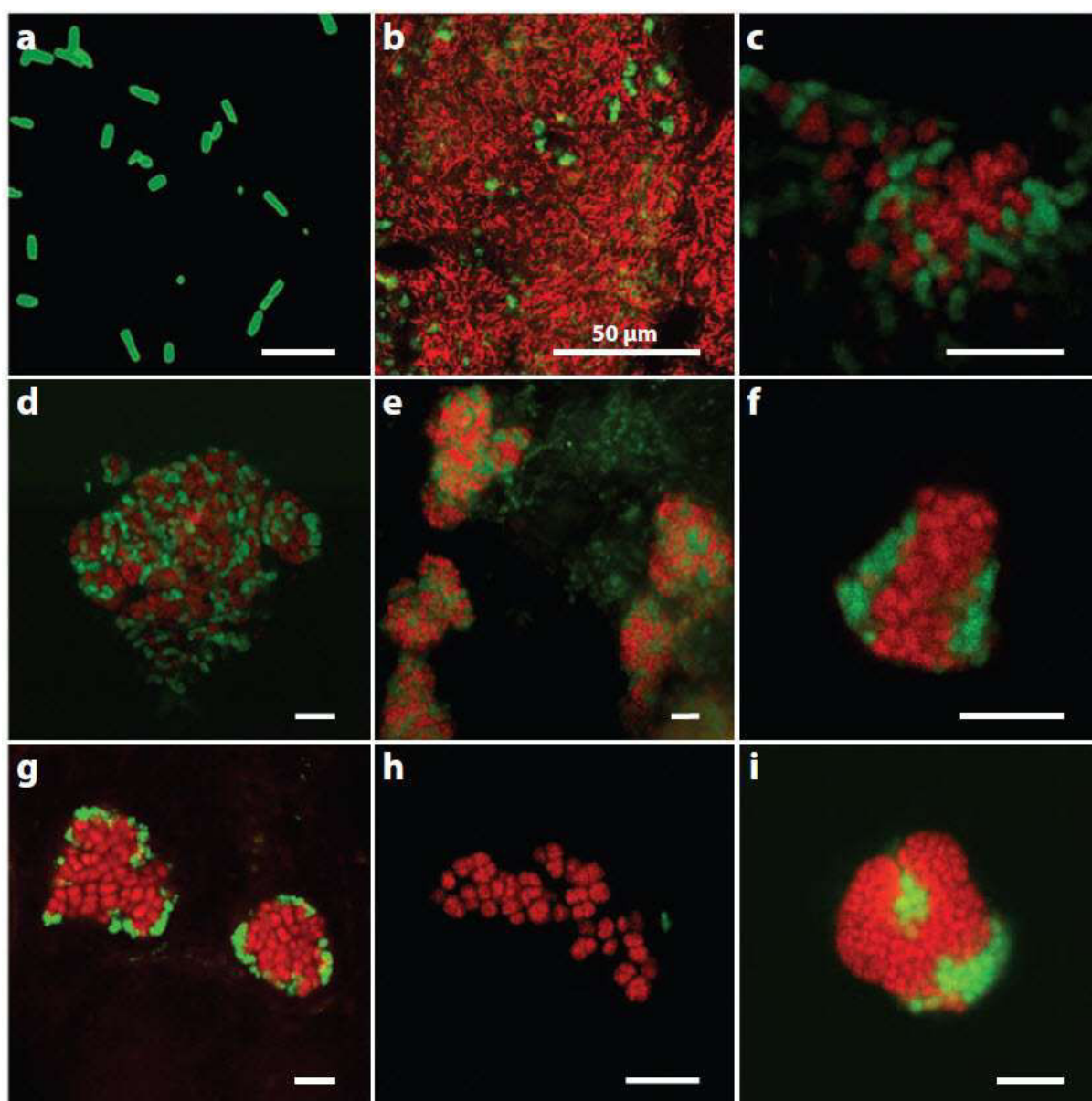


Figure 16 : ANME observées en épifluorescence par FISH ou CARD-FISH (Knittel et Boetius, 2009), (a) ANME-1 cellules seules (Black Sea), (b) ANME – 1 (rouge) en consortium avec *Desulfosarcina* (vert), (c, d, e) ANME – 2a (rouge) en consortium avec *Desulfosarcina* (vert), (f, g) ANME – 2c (rouge) en consortium avec *Desulfosarcina* (vert), (h) ANME – 2c (rouge) cellules seules et (i) ANME – 3 (rouge) en consortium avec *Desulfobulbus*.

Comme dit précédemment, les ANME ont été intensivement étudiés au cours des dernières années montrant ainsi leur affiliation phylogénétiquement proche des méthanogènes. Hallam *et al.* (2003) ont démontré que les ANME possèdent le gène *mcrA* (associé à la méthanogénèse), mais que celui-ci présente des modifications au niveau de parties hautement conservées, sujettes à des méthylations affectant la géométrie de la protéine. De plus, Hallam *et al.* (2003) ont démontré que ce gène permet une identification fonctionnelle des ANME au même titre que l'ADNr 16S (Figure 17). Chez les ANME-1, presque tous les gènes impliqués dans la méthanogénèse sont présents (Hallam *et al.*, 2004). L'hypothèse avancée étant que l'oxydation du méthane par les ANME serait issue de la méthanogénèse inverse. Kruger *et al.* (2003), ajoutent une preuve biochimique à cette hypothèse en isolant un complexe enzymatique, appelé Ni-protein I et II, associé au cofacteur F₄₃₀, ayant un très fort degré de similarité avec MCR et étant présent dans 10% des protéines extraites (7% Ni-protein I et 3% Ni-protein II) alors qu'il n'a jamais été identifié chez les archées méthanogènes. Ces Ni-protéines ont été identifiées comme étant MCR du fait de leur structure, de leur composition et du cofacteur F₄₃₀. La Ni-protein I a un cofacteur F₄₃₀ modifié contrairement à la Ni-protein II. La première a été identifiée chez les ANME - 1 et la seconde chez les ANME - 2 (Thauer & Shima, 2008). Le nickel présent au centre du cofacteur F₄₃₀ permet de catalyser l'oxydation du méthane chez les ANME (Figure 18).

Une récente étude a mis en évidence le fait que les ANME (au moins les ANME-1) sont capables d'être à la fois producteurs et consommateurs de méthane. En effet, Lloyd *et al.* (2011) ont émis l'hypothèse que les ANME -1 sont potentiellement capables de passer de la méthanogénèse à l'AOM et inversement. Scheller *et al.* (2011) ont démontré expérimentalement que l'enzyme MCR des méthanogènes est capable de réaliser l'AOM à des taux proches de ceux observés dans le milieu naturel, validant ainsi l'hypothèse de la voie de la méthanogénèse inverse (Figure 18).

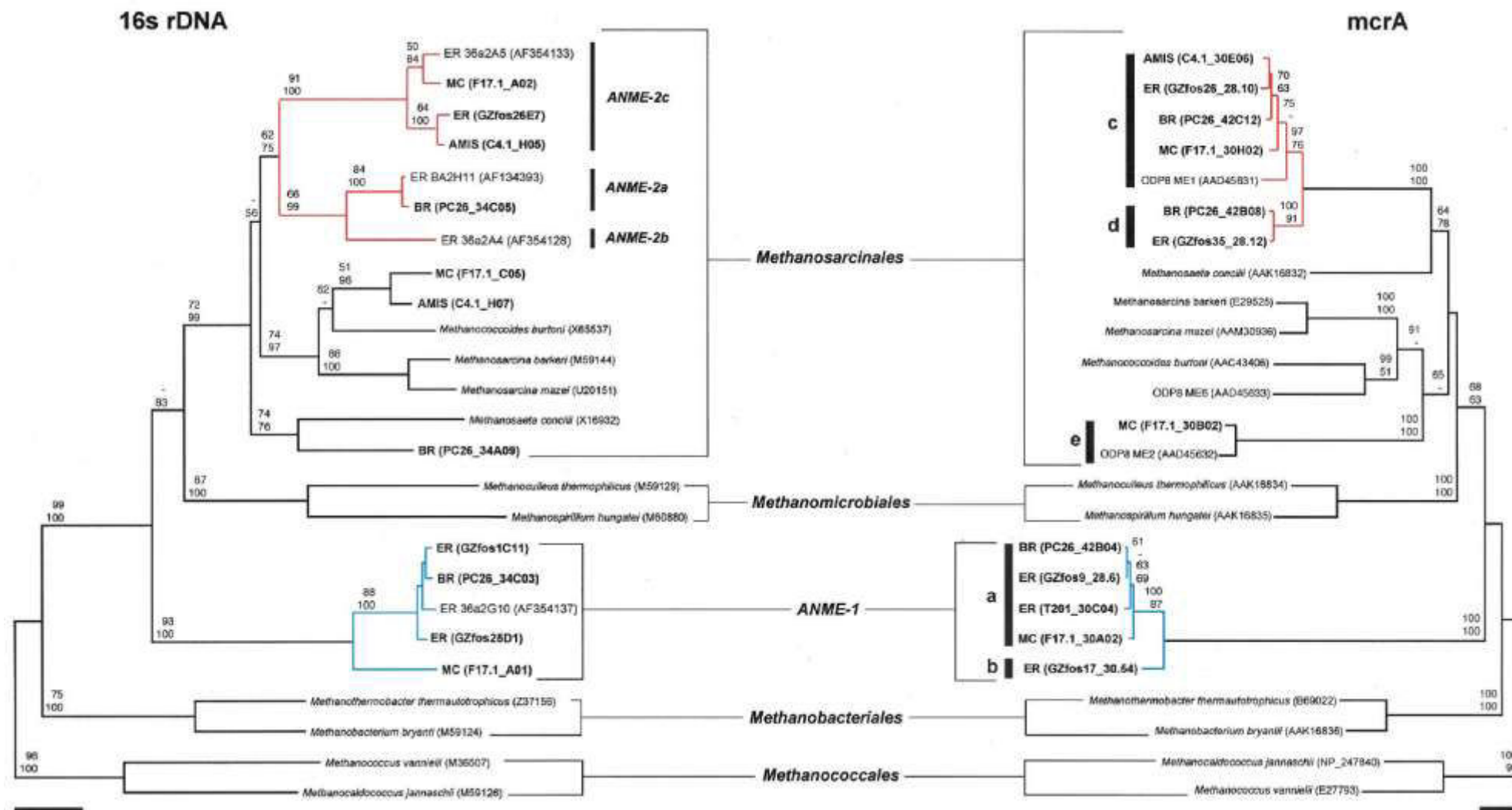


Figure 17 : Comparaison des arbres phylogénétiques de l'ADNr16S et du gène *mcrA* basée sur des séquences environnementales et des espèces méthanogènes, d'après Hallam *et al.* (2003). Les valeurs de bootstraps sont basées sur 1000 répliquats et seules les valeurs supérieures à 50% sont indiquées. L'arbre a été enraciné avec *Methylococcus* spp.. Les ANME - 1 sont représentés en bleu et les ANME - 2 en rouge. Abréviations : ER; Eel River ; MC, Monterey Canyon ; AMIS, microcosmes ; BR, Blake Ridge.

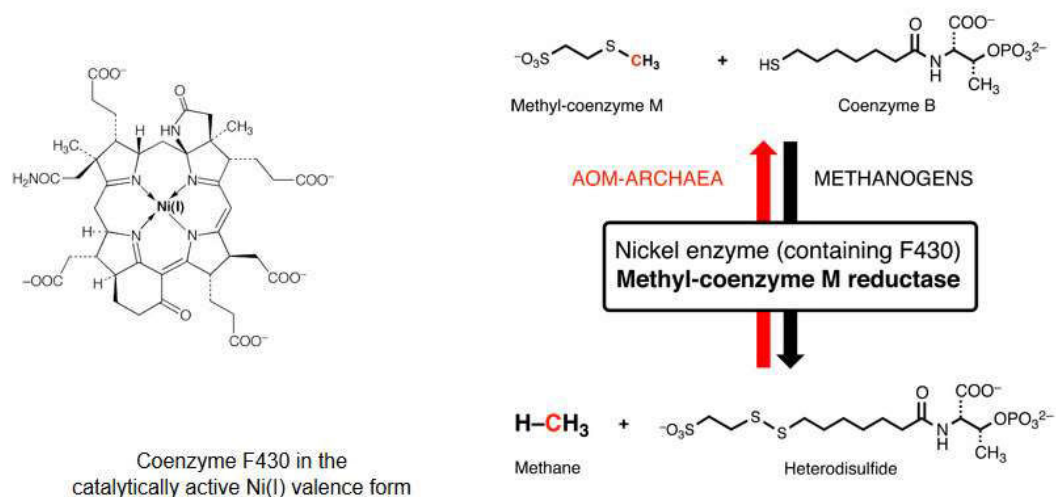


Figure 18 : Représentation du cofacteur F₄₃₀ chez les ANME et schéma de la dernière étape de la méthanogénèse et la première de la méthanogénèse inverse dans l'oxydation anaérobie du méthane par les ANME, d'après Jaun & Thauer, (2009).

ii. L'AOM dans les lacs

L'étude de l'oxydation anaérobie du méthane dans les écosystèmes lacustres est relativement récente et peu de travaux ont été réalisés comparativement au milieu marin. L'une des grandes différences avec les écosystèmes marins est la faible concentration en sulfates dans les sédiments des écosystèmes lacustres. Étant donné que les premières preuves d'AOM dans l'environnement ont été montrées par le couplage avec des SRB, l'AOM dans les lacs n'a pas été très étudiée. Toutefois, elle a été mise en évidence à la fois dans les sédiments et la colonne d'eau des lacs stratifiés depuis le début des années 2000 (Stein *et al.*, 2001 ; Eller *et al.*, 2005 ; Raghoebarsing *et al.*, 2006 ; Jiang *et al.*, 2008 ; Crowe *et al.*, 2010 ; Schubert *et al.*, 2011). Avec un taux d'oxydation de l'ordre de $0,0001 - 1 \text{ nmol.cm}^{-3}.\text{jr}^{-1}$ (Knittel & Boetius, 2009), l'AOM dans les lacs est 10^3 à 10^4 fois plus faible que dans les écosystèmes marins.

Les principaux acteurs identifiés sont les ANME -1 (Eller *et al.*, 2005, Jiang *et al.*, 2008 ; Crowe *et al.*, 2010) et les AAA (Stein *et al.*, 2001 ; Raghoebarsing *et al.*, 2006 ; Auguet *et al.*, 2011 ; Schubert *et al.*, 2011). Toutefois, Eller *et al.* (2005) ont identifié des ANME -2 dans l'hypolimnion anoxique du lac Plußsee (Allemagne) et Crowe *et al.* (2010) ont détecté des ANME -2 et -3 dans le monimolimnion du lac Matano (Indonésie). Les processus d'AOM mis en jeu par ces organismes dans les écosystèmes lacustres sont encore peu clairs bien que des preuves indirectes d'AOM aient été montrées dans ces différentes études.

L'identification des AAA est encore incertaine, bien que ces archées identifiées dans les différents lacs dans des zones d'oxydation anaérobie du méthane possèdent le gène *mcrA*. La question actuelle étant de savoir si ces AAA sont capables de réaliser à la fois l'AOM et la méthanogénèse comme les ANME -1 (Lloyd *et al.*, 2011 ; Scheller *et al.*, 2011).

IV. Distribution des communautés méthanogènes et méthanotrophes dans les sédiments lacustres

La compréhension de la dynamique spatiotemporelle des communautés microbiennes benthiques et des facteurs qui les contrôlent est essentielle pour mieux appréhender le fonctionnement du compartiment benthique. La diversité bactérienne dans les sédiments est influencée par de nombreux facteurs physico-chimiques tels que la teneur en eau (Hewson *et al.*, 2007), le pH (Hollister *et al.*, 2010), le potentiel d'oxydo-réduction (Edlund *et al.*, 2008), la taille des particules (Jackson & Weeks, 2008), la salinité (Swan *et al.*, 2010), la matière organique et les teneurs en nutriments comme l'azote et le phosphore (Hollister *et al.*, 2010). Quant à la diversité archéenne, elle semble être influencée par un nombre moins important de facteurs environnementaux ; en effet Auguet *et al.* (2010) ont montré que l'habitat (sol vs. zone benthique et pélagique) était le facteur le plus déterminant dans la distribution des archées, suivi de la salinité, de la teneur en oxygène et enfin de la température. Les méthanogènes et les méthanotrophes ne représentent qu'un faible pourcentage de la richesse bactérienne et archéenne mais leur rôle dans le cycle du méthane en fait des organismes importants.

Nous avons vu précédemment que les écosystèmes lacustres peuvent représenter une source importante de méthane et que les estimations quant à leurs émissions sont en constante augmentation. Le méthane est produit par les méthanogènes dans les compartiments anoxiques des lacs (sédiments et hypolimnion dans les lacs stratifiés, Figure 19). Le gaz diffuse dans les sédiments jusqu'à l'interface eau-sédiment où il est libéré dans la colonne d'eau. Celui-ci peut ensuite être transporté *via* différentes voies au sein du lac jusqu'à l'atmosphère (Figure 19). Au cours de son transport dans le lac, tout ou partie du méthane produit peut être oxydé, en conditions anaérobies par les ANME et des bactéries (NC10) et en conditions aérobies par les bactéries méthanotrophes (Figure 19). La complexité des

processus mis en jeu au cours du cycle du méthane, les différentes communautés impliquées et les facteurs environnementaux qui les structurent, de même que ceux influençant la méthanogénèse et la méthanotrophie, sont aujourd'hui des éléments essentiels afin de comprendre l'ensemble du cycle du méthane et *in fine* les émissions de ce gaz dans l'atmosphère.

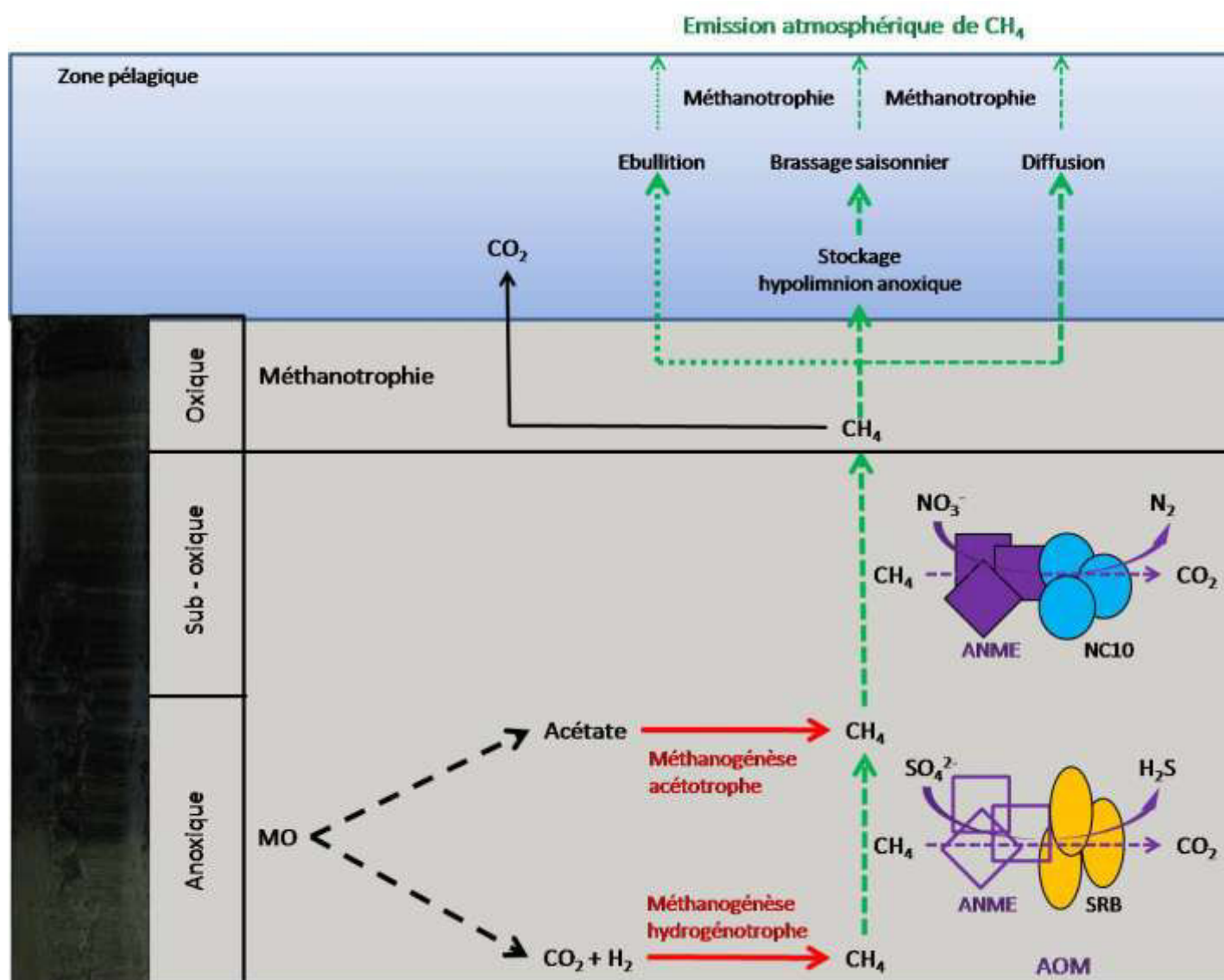


Figure 19 : Schéma bilan des principales voies de production, de consommation et d'émission du méthane dans les écosystèmes lacustres. Illustration d'une carotte sédimentaire par une photo d'une carotte prélevée en mai 2011 sur le Lac du Bourget (110 m). Abréviations : AOM, anaerobic oxydation of methane ; ANME, anaerobic methanotrophs ; SRB, bactéries sulfato - réductrice ; MO, matière organique.

1. Diversité et distribution des méthanogènes dans les sédiments lacustres

Dans les écosystèmes lacustres la diversité et la distribution des méthanogènes varient en fonction de nombreux paramètres environnementaux tels que le substrat, la profondeur sédimentaire ou encore la température. Toutefois, les études sur ces communautés (Falz *et al.*, 1999 ; Earl *et al.*, 2005 ; Lehours *et al.*, 2007 ; Schwarz *et al.*, 2007 ; Auguet *et al.*, 2010 ; Anthony *et al.*, 2012) montrent une dominance des *Methanomicrobiales* qui représentent environ 43% des séquences retrouvées dans les sédiments (Borrel *et al.*, 2011 ; Chaudhary *et al.*, 2013). Les genres dominants sont *Methanoregula* (environ 33% des séquences), *Methanolinea* (environ 5%) et *Methanospirillum* (2,5%). Les *Methanosarcinales* sont le second ordre le plus souvent identifié, notamment les genres *Methanosaeta* et *Methanosarcina*. Enfin, les *Methanobacteriales* sont fréquemment détectées dans des lacs, notamment les écosystèmes eutrophes à hypereutrophes, mais ne représentent qu'une faible proportion des méthanogènes totaux. Les *Methanosarcinales* sont, le plus souvent, présentes dans les strates peu profondes des sédiments, jusqu'à une quinzaine de centimètres (Koizumi *et al.*, 2003 ; Chan *et al.*, 2005 ; Zhang *et al.*, 2014) où l'on trouve les composés intermédiaires issus de la dégradation de la matière organique. A l'inverse, les *Methanomicrobiales* semblent devenir de plus en plus dominantes avec la profondeur (Chan *et al.*, 2005 ; Zhang *et al.*, 2014), où les conditions favorisent la méthanogénèse hydrogénotrophe. La richesse des méthanogènes est variable entre les études sur les différents écosystèmes lacustres, allant d'une faible richesse de quelques OTU sur les lacs eutrophes et peu profonds Dagow (9,5 m, Glissman *et al.*, 2004), Kinnerret (43 m, Schwarz *et al.*, 2007 et 2008) et Priest Pot (3,5 m, Earl *et al.*, 2005) à une douzaine voire une vingtaine d'OTU sur les lacs profonds Lonar (170 m, Antony *et al.*, 2012) et Pavin (92 m, Biderre-Petit *et al.*, 2011). Les lacs peu profonds et oxygénés présentent généralement une diversité plus faible que les lacs profonds désoxygénés voire anoxiques (permanent ou temporairement). Quant à l'abondance des méthanogènes elle varie entre 10^6 et 10^7 copies.g⁻¹ sédiment sec en fonction des études (Borrel *et al.*, 2012 ; Zhang *et al.*, 2014). Zhang *et al.* (2014) observent une abondance relativement constante dans les sédiments du lac Wulongtan comprise entre 7 et 8.10^6 copies/g sédiments secs (entre 0 et 33 cm de profondeur) alors que dans les sédiments du Lac Pavin Borrel *et al.* (2012) montrent une diminution de l'abondance des méthanogènes comprise entre 4.10^7 (0-3 cm) et 4.10^6 copies/g sediments secs (36-38 cm).

Les écosystèmes lacustres sont en général des environnements avec une salinité très faible (à l'exception des lacs salés) comparativement aux sédiments marins, or la salinité est le paramètre le plus discriminant pour la structure des communautés archéennes dans l'environnement (Auguet *et al.*, 2010). La salinité est donc discriminante pour la structure des méthanogènes entre les environnements salins et non salins, avec une dominance des *Methanomicrobiales* dans les premiers et des *Methanosarcinales* dans les seconds (Auguet *et al.*, 2010). Au sein d'un écosystème lacustre, l'un des paramètres les plus structurant pour les méthanogènes est le substrat (cf partie II. 1. ii), tant par sa quantité que sa qualité. Des études ont montré que les méthanogènes hydrogénotrophes semblent être favorisés dans les lacs car ils sont plus compétitifs à de faibles concentrations de substrats (Imachi *et al.*, 2008 ; Sakai *et al.*, 2009). Sakai *et al.* (2009) ont mis en évidence un changement de diversité des méthanogènes en fonction du substrat. Ainsi les milieux riches en dihydrogène et/ou formate auraient une faible diversité (principalement *Methanobacterium*, Sakai *et al.*, 2009) alors que les milieux qui accumulent les intermédiaires métaboliques de la dégradation de la matière organique auraient une plus grande diversité (en genres et en ordres, Sakai *et al.*, 2009). L'abondance relative des méthanogènes est aussi sujette à l'influence du substrat. L'abondance de *Methanobacterium* et *Methanospirillum* augmente avec la pression partielle d'H₂, et inversement pour l'abondance des autres *Methanomicrobiales* et *Methanocellales* (Sakai *et al.*, 2009). Des études ont montré que, dans les Lacs de Constance (Schulz & Conrad, 1995) et Kinneret (Schwarz *et al.*, 2008), la décomposition de la biomasse algale était à l'origine d'une accumulation d'acétate et de composés intermédiaires issus de cette dégradation. La modification de la concentration de ces substrats est à l'origine d'une augmentation de la concentration de méthane produit et de l'abondance des *Methanocaeataceae* (Schwarz *et al.*, 2008). Dans les écosystèmes lacustres, les apports de matières organiques par sédimentation sont à l'origine de variations saisonnières qui semblent avoir un impact sur la diversité des méthanogènes et des productions de méthane (Schulz & Conrad, 1995 ; Chan *et al.*, 2005 ; Schwarz *et al.*, 2008). Toutefois encore peu d'études ont été menées sur l'impact des changements d'apports de matières organiques sur les méthanogènes dans les sédiments lacustres.

La plupart des études sur des lacs ont été réalisées sur des écosystèmes tempérés dont les températures sont généralement inférieures à 15°C en moyenne sur l'année. Par conséquent, les méthanogènes dominants sont adaptés à ces environnements tempérés, ce qui ne permet pas de représenter l'ensemble des méthanogènes et notamment les

Methanobacteriales et *Methanococcales* qui sont plutôt thermophiles. Récemment Conrad *et al.*, 2010 ont étudié des lacs tropicaux dont la température des sédiments avoisine les 30°C et leurs résultats ont démontré une forte proportion de séquences de *Methanocellales* (jusqu'à 16%) alors que celles-ci sont quasiment absentes dans les lacs tempérés. De plus, ce sont les *Methanosaetaceae* qui ont été principalement retrouvées (23 – 34%) dans ces lacs tropicaux contrairement aux *Methanosarcinaceae* dans les lacs tempérés. Ceci est expliqué par la plus grande compétitivité des *Methanosaetaceae* dans les environnements avec de faibles concentrations en acétate (Jetten *et al.*, 1992). De plus, Glissman *et al.* (2004) ont montré que la production de méthane à partir d'acétate était supérieure à 4°C qu'à 30°C et que le méthane était plutôt produit à partir de H₂ lorsque les températures sont élevées (30°C). Ces études montrent que la température affecte la méthanogénèse et que la structure des méthanogènes est différente dans les lacs tropicaux par rapport aux écosystèmes lacustres tempérés. L'étude de ces écosystèmes tropicaux revêt donc un intérêt particulier dans le contexte actuel de réchauffement climatique. Ces lacs permettent d'appréhender les changements qui pourraient avoir lieu au sein de cette communauté et sur ces activités en cas de réchauffement des écosystèmes lacustres tempérés.

La littérature sur la variabilité spatiale et/ou temporelle des méthanogènes dans les sédiments lacustres est peu abondante. La variabilité spatiale est le plus souvent étudiée dans la verticalité des sédiments, comme décrit précédemment dans cette partie (Koizumi *et al.*, 2003 ; Chan *et al.*, 2005 ; Zhang *et al.*, 2014), au détriment de la variabilité spatiale horizontale. En effet, la plupart des études se basent sur un seul point, le plus souvent le point le plus profond du lac (Falz *et al.*, 1999 ; Earl *et al.*, 2005 ; Schwarz *et al.*, 2007 et 2008 ; Borrel *et al.*, 2012) alors que peu d'études s'appuient sur des transects horizontaux afin de comprendre les différences de structure et d'abondance des méthanogènes entre les zones littorales et pélagiques des lacs. Les zones littorales, peu profondes, oxygénées, peuvent être soumises à des changements de température et à des variations hydriques parfois très importantes comparativement aux zones pélagiques profondes, notamment dans les grands lacs profonds, qui sont susceptibles de présenter de longues périodes d'anoxie hypolimnique (voire avec l'installation d'un monimolimnion dans le cas de lacs méromictiques, ex : Lac Pavin) et une température hypolimnique constante. Quant à la variabilité temporelle, là aussi les études sur les écosystèmes benthiques lacustres sont peu nombreuses (Chan *et al.*, 2005 ; Earl *et al.*, 2005 ; Schwarz *et al.*, 2008). L'étude de Chan *et al.* (2005) ne montre pas de variabilité temporelle de la structure des méthanogènes dans les sédiments du lac Dagow entre

mai (début de stratification lacustre) et août (stratification lacustre établie depuis plusieurs mois) de la même année. A l'inverse l'étude de Earl *et al.* (2005) met en évidence une variabilité de la richesse des méthanogènes dans les sédiments du lac Priest Pot. Le nombre d'OTU détecté passant de 13 en décembre à 2 en août : ce lac présente cependant un fonctionnement biogéochimique particulier, du fait d'une accumulation de H₂S durant la période anoxique (entre mai et septembre) et du développement des SRB. Ces dernières étant plus compétitives que les méthanogènes à de fortes concentrations de soufre, elles se développent au détriment des méthanogènes. A l'automne (octobre), la réoxygénation des sédiments modifie le gradient d'oxydoréduction, les méthanogènes redeviennent alors compétitifs, du fait de la diminution du soufre dans les sédiments, et se développent à nouveau, la richesse augmentant alors jusqu'à 7 OTU. Enfin l'étude de Schwarz *et al.* (2008) sur le lac Kinneret, montre clairement un changement dans la communauté méthanogène avec la sédimentation de la biomasse algale, avec une rescrudescence de *Methanosaeta*, méthanogène acétotrophe. Ceci permet de souligner l'importance d'étudier cette communauté sous différents aspects spatiotemporels en lien avec la dynamique lacustre.

2. Diversité et distribution des méthanotrophes dans les sédiments lacustres

Plusieurs paramètres environnementaux, tels que le substrat, l'oxygène ou encore la température, sont à l'origine de changements dans la diversité et la distribution des méthanotrophes dans les écosystèmes lacustres

Toutefois, les études sur ces communautés (Costello & Lidstrom, 1999, Auman *et al.*, 2000 ; Rahalkar & Schink, 2007 ; Schubert *et al.*, 2010 ; Biderre-Petit *et al.*, 2011 ; Deutzmann *et al.*, 2011) ont montré la dominance des méthanotrophes de Type I, qui représentent environ 59% des séquences retrouvées dans les sédiments (Borrel *et al.*, 2011). Les genres dominants sont *Methylobacter* (environ 51% des séquences), *Methylosarcina* (environ 4%) et *Methylomonas* (environ 4%). Les méthanotrophes de Type II (*Methylocystaceae*) sont souvent détectés dans ces écosystèmes mais en proportions moins importantes. De plus, il a été montré, dans les sédiments du Lac Stechlin, que les 2 types étaient actifs (Dumont *et al.*, 2011). Il semblerait que les méthanotrophes de Type II (*Methylocystaceae*) soient plutôt dominants dans les écosystèmes tropicaux avec des températures élevées (entre 25 et 30°C). Ainsi plusieurs auteurs ont émis l'hypothèse que des

températures inférieures à 20°C favorisent les Type I (Dumestre *et al.*, 2002 ; Kojima *et al.*, 2009, Tsutsumi *et al.*, 2011). La richesse des méthanotrophes est variable selon les études menées sur différents écosystèmes lacustres, allant d'une faible richesse de quelques OTU sur les lacs Dagow (Dumont *et al.*, 2013) et Pavin (Biderre-Petit *et al.*, 2011) à une vingtaine d'OTU sur le Lac de Constance (Bussman *et al.*, 2004 ; Deutzman *et al.*, 2011). Quant à l'abondance des méthanotrophes, elle varie entre 10^7 et 10^8 copies.g⁻¹ sédiment frais en fonction des études (Costello *et al.*, 2002 ; Rahalkar *et al.*, 2009 ; Deutzman *et al.*, 2011).

Les méthanotrophes se situent principalement aux zones d'interface oxique / anoxique où la concentration en oxygène diminue mais est suffisante pour leurs activités et où les concentrations de méthane sont importantes, car il remonte des zones les plus anoxiques. Dans les écosystèmes lacustres, ces zones sont principalement dans les strates de surface du sédiment (premiers centimètres) et dans la colonne d'eau profonde (oxycline pour les lacs stratifiés). Ces zones sont des lieux de compétitions entre les méthanotrophes et les autres communautés microbiennes, notamment pour l'accès à l'oxygène. La compétition entre les méthanotrophes se fait principalement entre les Type I et II dans les écosystèmes lacustres. Ainsi en cas de compétition pour une ressource, les Type II vont préférer des environnements riches en méthane et limités en oxygène contrairement aux Type I (Amaral & Knowles, 1995). Cette préférence est liée au fait que, d'une part les méthanotrophes de Type I ont besoin de cuivre et d'azote pour leur croissance (Chowdhury & Dick, 2013), éléments qui se trouvent préférentiellement dans les zones les plus oxygénées et d'autre part parce que les méthanotrophes de Type I semblent répondre plus rapidement aux changements environnementaux (interface eau-sédiment par exemple), du fait d'une croissance rapide, contrairement aux méthanotrophes de Type II (Semrau *et al.*, 2010 ; Ma *et al.*, 2013). Ainsi la distribution spatiale des méthanotrophes de Type I et II dans les sédiments lacustres permet de limiter la compétition entre les 2 Types pour les ressources.

La concentration en azote est un paramètre dont les effets sur les communautés méthanotrophes ont été étudiés, toutefois les résultats sont contradictoires. Des études ont montré que l'ammonium inhibait l'oxydation du méthane du fait de la compétition entre les molécules dont la structure chimique est proche (CH₄ et NH₄⁺, Bosse *et al.*, 1993 ; Nold *et al.*, 1999 ; Murase & Sugimoto, 2005). Selon les études, les seuils de concentration responsable de l'inhibition variaient, allant de 200 µM (Murase & Sugimoto, 2005) à 15 mM de NH₄⁺ (Liikanen & Martikainen, 2003). A l'inverse Bodelier & Lannbroek (2004) ont montré que l'ajout d'ammonium dans le milieu augmente la consommation de méthane notamment quand

les conditions en azote sont limitantes, ceci pouvant s'expliquer par le fait que les méthanotrophes de Type I ont besoin d'azote pour leur croissance contrairement au Type II. Mohanty *et al.* (2006) ont montré dans les sols que les méthanotrophes de type I et II ne réagissent pas de la même façon à l'ajout de fertilisant dans le milieu, les premiers sont stimulés et leur croissance de même que la consommation de méthane augmentent alors que les seconds sont inhibés. Les méthanotrophes de type I dominant dans les sédiments lacustres, l'étude de Mohanty *et al.* (2006) va donc dans le sens des observations faites par Bodelier & Lannbroek (2004). Toutefois, les effets de l'azote sur l'activité des méthanotrophes, de même que les impacts sur leur diversité et leur abondance restent largement incompris à l'heure actuelle.

Les méthanotrophes sont le point d'entrée du carbone issu de la méthanogénèse dans le réseau trophique, or, ceux-ci peuvent être broutés par différents organismes, transférant ainsi le carbone issu du méthane dans la chaîne trophique. Des études ont montré que les chironomes, les cladocères, les amibes, les ciliés et les flagellés peuvent utiliser les méthanotrophes comme source de nourriture (Muraze & Frenzel, 2007 ; Kankaala *et al.*, 2006 ; Jones *et al.*, 2008 ; Jones & Grey, 2011). Les chironomes sont les macro-invertébrés détritivores benthiques dominants dans les lacs (Jones & Grey, 2011). Une étude de Jones *et al.* (2008) a montré que pour près d'un tiers des lacs étudiés (87 lacs sur l'ensemble du globe), les larves de chironomes contenaient au moins 40% de leur biomasse en carbone issus de la méthanogénèse *via* le broutage des méthanotrophes. Cette valeur pouvant atteindre les 70% dans certains cas (Jones *et al.*, 2008). Ces variations sont expliquées par des différences de broutage des méthanotrophes entre les espèces de chironomes (Kelly *et al.*, 2004) mais aussi entre les écosystèmes lacustres (Kelly *et al.*, 2004) et par des variations saisonnières en lien avec la stratification lacustres (Deines *et al.*, 2007). Lorsque l'interface eau-sédiment est oxygénée les chironomes réalisent la bioturbation du sédiment qui modifie les conditions d'oxygénation en favorisant la diffusion de l'oxygène (Jones & Grey, 2011). Ceci modifiant d'une part la distribution des méthanotrophes (Deines *et al.*, 2007) et d'autre part les taux d'oxydation du méthane. Même si les méthanotrophes ne sont pas l'essentiel de l'alimentation des chironomes, ces derniers modifient l'abondance de cette communauté, de même que leur distribution et potentiellement leur structure *via* un broutage sélectif (Muraze & Frenzel, 2008 ; Jones & Grey, 2011).

La littérature sur la variabilité spatiale et/ou temporelle des méthanotrophes dans les sédiments lacustres est peu abondante. Pour ce qui est de la variabilité spatiale, la plupart des

études se basent sur un seul point d'échantillonnage (Auman *et al.*, 2000 ; Costello *et al.*, 2002 ; Bussman *et al.*, 2004). En revanche, sur le Lac de Constance (Allemagne), plusieurs études (Pester *et al.*, 2004 ; Rahalkar *et al.*, 2009 ; Deutzman *et al.*, 2011) ont étudié la structure et l'abondance des méthanotrophes entre les zones littorales (2 à 5 m de profondeur) et pélagiques (80 – 90 m). Les études de Pester *et al.* (2004) et de Deutzman *et al.* (2011) montrent une différence de structure des méthanotrophes benthiques entre la zone littorale et la zone pélagique alors que le lac est en cours de stratification et sans zone anoxique. En intégrant les 4 premiers centimètres des sédiments, Deutzman *et al.* (2011) observent une abondance des méthanotrophes plus importante en zone profonde par rapport à la zone littorale. Le même résultat est obtenu lorsque l'interface eau-sédiment (0-0,5 cm) uniquement est considérée alors que l'abondance des méthanotrophes est similaire entre les zones littorales et pélagiques dans la profondeur sédimentaire, avec une abondance maximale autour de 2-3 cm (Rahalkar *et al.*, 2009). Les études sur les méthanotrophes sont le plus souvent réalisées à une seule date (Costello *et al.*, 2002 ; Rahalkar & Schink, 2007 ; He *et al.*, 2012) par conséquent peu d'informations sont connues quant à la variabilité temporelle de cette communauté. Seul Pester *et al.* (2004) ont comparé la structure des méthanotrophes dans les sédiments du Lac de Constance entre les périodes de stratification et de brassage (août/septembre et décembre) en considérant les zones littorales (2 m) et profondes (90 m) et la verticalité des sédiments (0-1 cm et 10 cm). Un changement dans la structure des méthanotrophes benthiques entre la strate de surface et la strate profonde a été observé, en zone littorale uniquement. Cette étude met en lumière l'importance d'étudier cette communauté sous différents aspects spatiotemporels à la fois dans différentes zones lacustres à l'échelle horizontale mais aussi dans la profondeur des sédiments à l'échelle verticale tout en tenant compte des changements liés à la stratification lacustre.

L'ensemble de ces travaux indiquent que la structure, l'abondance et l'activité des méthanotrophes benthiques doivent être intégrées à la fois à l'échelle spatiale, en prenant en compte les différentes zones du lac, le long d'un transect littoral-pélagique et dans la verticalité des sédiments, et à l'échelle temporelle, en prenant en compte des changements liés à la stratification lacustre.

Comme nous venons de le voir la diversité des méthanogènes et des méthanotrophes est relativement bien connue dans les écosystèmes lacustres, toutefois le lien entre la diversité observée et le fonctionnement de ces communautés reste encore à éclaircir, de même que les facteurs environnementaux qui les influencent. L'oxygène est un paramètre important pour les deux communautés, en particulier dans les écosystèmes lacustres où l'oxygénation dans les sédiments varie en fonction des différents endroits du lac et de la stratification quand elle existe. Ainsi de nombreuses questions restent à approfondir notamment sur l'amplitude des changements de structure existant entre les différentes zones du lac à l'échelle horizontale. De même, pour ce qui est des variations temporelles de la structure et de l'abondance des méthanogènes et des méthanotrophes en lien avec des changements d'oxygénation liés à la stratification lacustre. Quant à l'influence des facteurs environnementaux sur la distribution de ces communautés il reste à savoir quels sont ceux qui ont une influence plutôt à l'échelle spatiale et ou à l'échelle temporelle et dans amplitude ils agissent sur les communautés méthanotrophes et méthanogènes.

Chapitre II

-

Matériels et Méthodes

I. Stratégie d'étude

1. Une approche écosystémique en lac profond

Comme le rapportent récemment Milucka *et al.* (2015), les écosystèmes lacustres stratifiés ayant une anoxie hypolimnique saisonnière sont des modèles d'étude à privilégier pour apporter de la connaissance sur les processus impliqués dans les 'bilans de méthane' des lacs. La présence d'oxydation aérobie du méthane en zone anoxique *via* l'utilisation de l'oxygène issu de la photosynthèse oxygénique du phytoplancton, comme le décrit cette étude, met en avant tout l'intérêt d'étudier ces lacs et les processus qui s'y déroulent.

Dans le cadre de ce travail, le Lac du Bourget a été pris comme modèle d'étude ; il s'agit d'un lac profond (147 m de profondeur maximale) monomictique, dont la stratification thermique annuelle conduit à la mise en place de l'hypolimnion devenant hypoxique (en été) voire anoxique pendant 3 à 4 mois (octobre à janvier) au cours de l'année (Jacquet *et al.*, 2011).

La dynamique saisonnière lacustre (stratification *vs.* brassage) induit des variations d'oxygénation à l'interface eau-sédiment et de modifications du gradient d'oxydoréduction dans les sédiments pouvant impacter les communautés microbiennes impliquées dans le cycle du méthane.

Le choix d'étude du Lac du Bourget est par ailleurs lié à la connaissance que nous avons du fonctionnement global de ce lac (suivis observatoires du SOERE OLA, thèses en sédimentologie par exemple Jenny, 2013 ; Giguët-Covex, 2010). Ces acquis ont notamment permis d'ajuster les choix relatifs à l'échantillonnage spatial et temporel réalisé dans le cadre de ce travail.

2. Choix et caractéristique des stations d'échantillonnages le long d'un transect de profondeur

Les stations choisies sont caractérisées par des dynamiques d'oxygénation à l'interface eau-sédiment et d'apports en matières organiques différents, à la fois qualitativement (autochtone *vs.* allochtone) et quantitativement (zone côtière avec les apports d'un affluent *vs.* zone pélagique). Selon les années (en fonction des facteurs climatiques) la "fraction anoxique" dans le Lac du Bourget varie, permettant de distinguer 3 zones au sein du Lac (Jenny, 2013) : une première zone allant de 0 jusqu'à 90 m de profondeur où la colonne d'eau

est oxygénée en permanence, une deuxième zone au delà de 140 m qui est anoxique (sauf aux périodes de brassage hivernal) et une zone d'oscillation de l'anoxie entre 90 et 140 m.

Les sédiments lacustres sont généralement dissociés en deux fractions, l'une autochtone, dépendant du fonctionnement interne du Lac, et l'autre allochtone, qui dépend des conditions environnementales externes (bassin versant). La part de chacune de ces fractions varie au cours du temps et ces variations reflètent la prédominance des processus internes ou externes impliqués dans le fonctionnement du Lac. Dans les sédiments du Lac du Bourget on retrouve ces 2 types d'environnements sédimentaires, avec (Jenny, 2013) :

- des zones dominées par une sédimentation allochtone, surtout silteuse, dans les deltas de la Leysse, du Sierroz et du Canal de Savière.
- des zones sédimentaires clastiques mélangées à des carbonates dans les zones les plus profondes, notamment dans la plaine centrale.

Sur la base de ces connaissances, l'échantillonnage des sédiments dans le Lac du Bourget a été réalisé sur 3 stations d'échantillonnage le long d'un transect de distance (Figure 20) :

- Station 1 (E 5°52'6.77" - N 45°39'46.91") : 65 m de profondeur et soumise aux apports allochtones de matière organique de la Leysse. Cette station a une saturation en oxygène annuelle qui varie entre 60 et 80%. De plus, elle est située dans une zone où la présence de biogaz dans les sédiments a été détectée par réflexion sismique (Chapron *et al.*, 2005).

- Station 2 (E 5°52'11.55" - N 45°40'57.41") : station intermédiaire à 110 m de profondeur et en dehors du panache de la Leysse. Elle est soumise principalement aux apports autochtones du Lac et ponctuellement à des apports allochtones de la Leysse (en cas de crues importantes). Sa saturation en oxygène annuelle est comprise entre 40 et 80% (Jacquet *et al.*, 2012), les sédiments d'interface sont continuellement oxygénés mais avec des variations importantes au cours de l'année.

- Station 3 (E 5°51'37.10" - N 45°44'43.60") : point le plus profond du lac à 147 m, soumis uniquement aux apports autochtones du lac. Sa saturation en oxygène annuelle est comprise entre 0 et 80%. Les sédiments d'interface sont anoxiques la plus grande partie de l'année et sont ré-oxygénés ponctuellement lors du brassage hivernal.

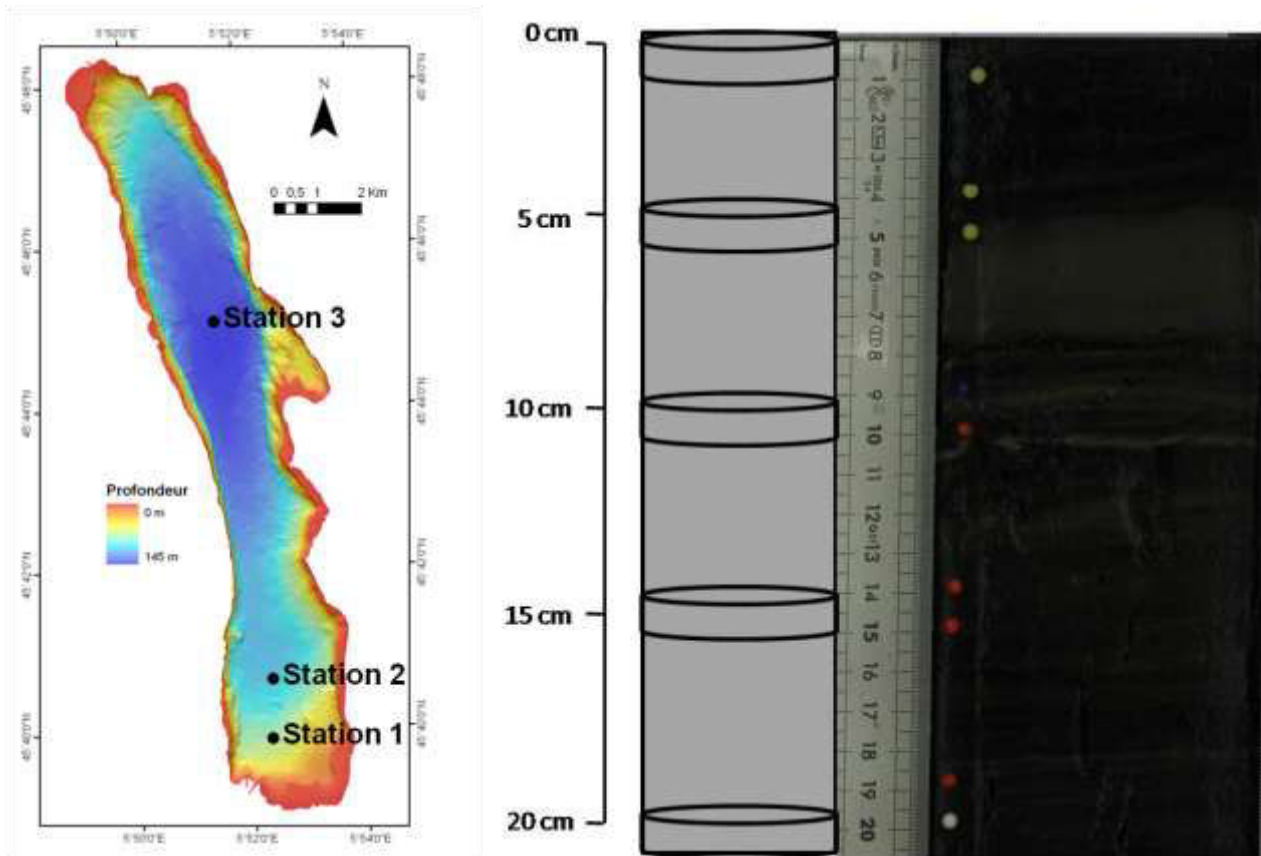


Figure 20 : Localisation des 3 stations d'échantillonnage (carte, Ledoux *et al.*, 2010) et représentation de l'échantillonnage dans la verticalité des sédiments sur une carotte prélevée en Décembre 2011 sur la station 2 du Lac du Bourget.

3. Stratégie d'échantillonnage à différentes échelles spatiales : de l'échelle intra-carotte aux comparaisons inter-stations le long d'un transect

Afin d'appréhender l'hétérogénéité spatiale à diverses échelles nous avons procédé (en décembre 2011) à des carottages répétés permettant d'estimer l'hétérogénéité des communautés microbiennes (Tableau 3) :

(i) à l'échelle intra-carotte *via* l'analyse de plusieurs réplicats ($n = 5$) pris au sein de strates sédimentaires de 1 cm de d'épaisseur

(ii) à l'échelle intra-station en nous appuyant sur l'analyse de 3 carottes prélevées simultanément au sein d'une aire de 1 m² en comparant 5 réplicats par strate sur chaque carotte ($n = 15$)

(iii) à l'échelle inter-station le long d'un transect horizontal en sélectionnant 3 stations d'échantillonnage présentées précédemment.

4. Les sédiments appréhender dans leur verticalité

La verticalité des sédiments est absolument nécessaire à prendre en compte, pour l'étude des communautés fonctionnelles méthanotrophes et méthanogènes. Les travaux de Brandl *et al.* (1990) sur les sédiments du Lac Léman ont mis en évidence 2 zones dans la verticalité : la première entre 0 et 10-15 cm de profondeur (diminution des concentrations en méthane sédimentaire), et une seconde au-delà de 15 cm de profondeur (concentration en méthane stable). Dans les sédiments du Lac du Bourget, l'échantillonnage dans la verticalité a été réalisé entre 0 et 20 cm de profondeur à partir de l'interface eau-sédiment (5 strates : 0-1, 4-5, 9-10, 14-15 et 19-20 cm, [Figure 20](#)).

5. Etude des variations temporelles à l'échelle annuelle

La variabilité temporelle de la dynamique des communautés méthanogènes et méthanotrophes est relativement peu étudiée dans les sédiments lacustres (cf synthèse bibliographique). Afin d'étudier l'influence de la dynamique saisonnière lacustre sur les communautés microbiennes benthiques dans le Lac du Bourget nous avons réalisé des prélèvements répétés au cours de l'année en fonction de l'état de stratification lacustre ([Tableau 3](#)) : mai 2011, correspond au début de la stratification lacustre suite au brassage hivernal (les stations échantillonnées présentent toutes une oxygénation de l'interface eau-sédiment); octobre et décembre 2011 correspondent à une stratification lacustre bien établie avec anoxie de la partie la plus profonde de l'hypolimnion pour la station 3 (147 m, saturation en oxygène à 0%) et février 2012, correspond au brassage hivernal et à une oxygénation homogène de la colonne (saturation en oxygène à 80% pour les 3 stations).

La variabilité temporelle a été analysée au sein de 3 stations le long d'un transect de distance à partir du principal affluent du Lac ([Figure 20](#)), à raison d'une seule carotte par station et de 2 réplicats par strates sédimentaires prise en compte ([Tableau 3](#)).

6. Les communautés microbiennes étudiées et les descripteurs sédimentaires

L'étude des communautés microbiennes benthiques a été réalisée sur 2 gènes de fonction : le gène de la méthyl co-enzyme M réductase, sous unité *alpha* (*mcrA*) pour les

méthanogènes et le gène de la méthane mono-oxygénase particulaire, sous unité *alpha* (*pmoA*) pour les méthanotrophes. La structure des communautés totales, bactéries et archées, auxquelles appartiennent les 2 communautés fonctionnelles étudiées a aussi été analysée. Pour cela, les marqueurs phylogénétiques suivants ont été génotypés : pour les bactéries, l'intergène entre l'ADNr 16S et 23S et pour les archées l'ADNr 16S.

Les communautés microbiennes benthiques ont été analysées en termes de structure par génotypage, d'abondance par PCR quantitative et de diversité par clonage – séquençage (Tableau 3). En parallèle de l'étude moléculaire des communautés microbiennes benthiques une analyse de la composition phénotypique des communautés microbiennes (Biolog) pour la strate d'interface eau-sédiment (Tableau 3).

Par ailleurs, les sédiments ont été caractérisés en termes de physico-chimie par les taux d'humidité, de matière organique, de carbonates, de carbone et azote total. De plus, la taille des particules sédimentaires a été mesurée de même que la saturation en oxygène à l'interface eau-sédiment (Tableau 3).

Tableau 3 : Tableau récapitulatif de la stratégie d'échantillonnage, des analyses moléculaires et physico-chimiques réalisées pour l'étude de la dynamique spatiale et temporelle des communautés microbiennes benthiques dans les sédiments du Lac du Bourget.

	Dynamique spatiale	Dynamique temporelle
Date d'échantillonnage	Décembre 2011	Mai, Octobre, Décembre 2011 et Février 2012
Stations d'échantillonnage	1 (65m), 2 (110m) et 3 (147m)	1 (65m), 2 (110m) et 3 (147m)
Nombre de carottes prélevées	Station 1 et 2 ($n = 3$) / Station 3 ($n = 1$)	$n = 1$ /station
Strates analysées	0-1 cm - 9-10 cm - 19-20 cm	0-1 cm - 4-5 cm - 9-10 cm - 14-15 cm - 19-20 cm
Nombre de répliquats / strate (n)	Comparaison intra-carotte : 5 Comparaison intra-station : 15 (3 carottes \times 5 répliquats) Comparaison inter-station : 10 (1 carotte \times 10 répliquats)	2
Communautés microbiennes étudiées et marqueurs moléculaires utilisés	Bactéries (ITS ADNr 16S-23S), Archées (ADNr 16S), méthanogènes (<i>mcrA</i>) et méthanotrophes (<i>pmoA</i>)	méthanogènes (<i>mcrA</i>) et méthanotrophes (<i>pmoA</i>)
Analyses moléculaires	Structure : génotypage	Structure : génotypage Abondance : qPCR Diversité : clonage & séquençage
Caractérisation des sédiments	% humidité, % de matière organique, % de carbonates, % de carbone total, % d'azote total, taille des particules sédimentaires, saturation en O ₂ à l'interface eau- sédiment	% humidité, % de matière organique, % de carbonates, % de carbone total, % d'azote total, taille des particules sédimentaires, saturation en O ₂ à l'interface eau- sédiment
Analyses complémentaires		Composition phénotypique des communautés microbiennes (Biolog), FCM

II. Présentation du site d'étude

1. Généralités

Le Lac du Bourget est situé en France, dans le département de la Savoie (45° 43' 55" Nord 5° 52' 06" Est, [Figure 21](#)). Entouré de montagnes, à l'ouest l'un des derniers massifs jurassiens (Massif de l'Epine, 1 485 m) et à l'est le massif des Bauges (Mont Revard, 1 538 m), le Lac du Bourget est d'origine glaciaire. Il s'est formé à l'issue de la dernière glaciation du Würm, il y a 19 000 ans, par le retrait des grands glaciers du quaternaire et repose sur un substrat carbonaté : la zone molassique péréalpine (Jenny, 2013) à 231 m d'altitude ([Tableau 4](#)). Sa taille et sa profondeur ([Tableau 4](#)) en font le plus grand lac de France.

Tableau 4 : Caractéristiques du Lac du Bourget (Jenny, 2013)

Longueur maximum	18 km
Largeur maximum	3,4 km
Superficie	44,5 km ²
Altitude moyenne	231,5 m
Profondeur maximum	147 m
Profondeur moyenne	80 m
Volume total	3,6 km ³
Superficie bassin versant	560 km ²
Renouvellement des eaux	Entre 6 et 13 ans
Régulation	Canal de Savière
Débit moyen à l'exutoire	> 15 m ³ .s ⁻¹

Le bassin versant, d'environ 560 km² ([Tableau 4](#)), peut être considérablement agrandi lorsque les eaux du Rhône se déversent dans le lac par le Canal de Savière, situé au Nord ([Figure 21](#)), et peut ainsi atteindre 4 600 km². Toutefois, suite aux travaux effectués sur le Rhône ceci reste exceptionnel. Ce bassin versant se divise en 4 sous bassins qui sont (Balvay *et al.*, 2012) :

- La Leysse : environ 281 km² à dominantes agricoles et urbaines (agglomération de Chambéry)

- Le Sierroz : environ 136 km² à dominantes agricoles et urbaines (agglomération d'Aix les Bains)
- La Chautagne : environ 57 km² principalement composée de marais
- Divers : allant du massif de l'Epine à la Biolle, soit environ 85 km² composés majoritairement de zones forestières.

Le Lac du Bourget est alimenté principalement par la Leyse (environ 70% des apports du Lac du Bourget) qui traverse Chambéry avant de se jeter au sud du Lac, et par le Sierroz (28% de ces apports du Lac du Bourget), qui traverse Aix les Bains avant de se jeter à l'est du Lac (Figure 21). Le Canal de Savière alimente également le Lac mais son apport est faible par rapport à ceux de la Leyse et du Sierroz (Figure 21).

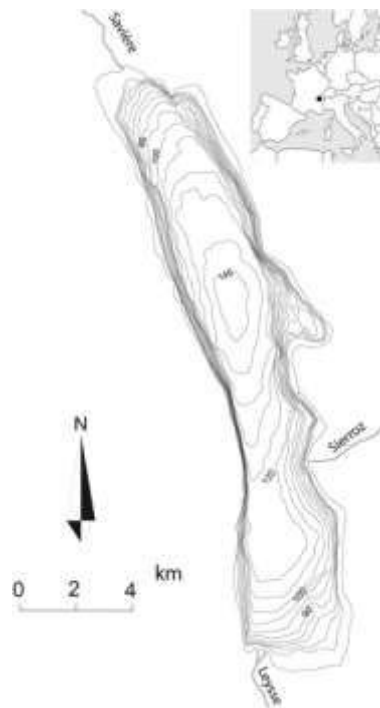


Figure 21 : Carte bathymétrique du Lac du Bourget et de ses principaux affluents (Ledoux *et al.*, 2010).

Le bassin versant du Lac du Bourget s'étend actuellement sur 61 communes, soit près de 200 000 habitants. La population autour du Lac a augmenté d'environ 50% au cours des 50 dernières années (Jenny, 2013) et s'est accompagnée d'une croissance importante des apports en nutriments (notamment en phosphore *via* les eaux usées principalement) dans le Lac. Afin de lutter contre le processus d'eutrophisation grandissant (Jacquet *et al.*, 2013) des travaux ont

été réalisés (stations d'épuration, détournement des eaux traitées dans le Rhône, déphosphatation des eaux) dans les années 1970 sur le bassin versant du lac afin d'assainir celui-ci. Giguët-Covex *et al.*, 2010 et Jenny, 2013 ont estimé, d'après les archives sédimentaires du Lac, que des conditions eutrophes et une désoxygénation des eaux profondes du Lac se sont mises en place simultanément à partir des années 1930-1940. Puis à partir des années 1960, les conditions anoxiques des couches d'eau les plus profondes sont devenues persistantes, avec une désoxygénation pouvant durer entre 189 et 274 jours au point le plus profond (Balvay *et al.*, 2012) et pouvant atteindre un volume maximal de 400.10^6 m^3 d'eau désoxygénée soit 8% du volume total du lac du Bourget (Jenny, 2013). Les eaux du Lac du Bourget sont stratifiées thermiquement (généralement entre avril et décembre) avec des températures de surface plus chaudes que celles en profondeur (ne dépassant pas 6°C). En hiver, les eaux du lac se refroidissent et l'on observe un brassage de la colonne d'eau associé à une réoxygénation des couches de fond ($\approx 80\%$ de la saturation en O_2).

Le Lac du Bourget fait depuis longtemps l'objet d'analyses physico-chimiques et biologiques de ses eaux. Depuis les années 1990, le point le plus profond du Lac, nommé « point B » sert de référence pour ces analyses (SOERE OLA, <http://www6.inra.fr/soere-ola>), en termes de température de l'eau, de transparence, de teneurs en oxygène et en ions. De plus, depuis une vingtaine d'années le suivi inclut des analyses relatives au phyto- et zooplancton. Ces analyses permettent de suivre l'état trophique du Lac qui est passé d'un état hyper eutrophe à la fin des années 1970 à un état oligo-mésotrophe actuellement avec des concentrations moyennes hivernales en phosphore total les plus faibles jamais mesurées ($11 \mu\text{gP.L}^{-1}$).

2. Les sédiments du Lac du Bourget

Les sédiments sont laminés avec une rythmicité saisonnière (Figure 22). Les lamines dans le Lac du Bourget sont de types biochimiques (Giguët-Covex, 2010 ; Jenny, 2013) avec un contraste entre la sédimentation printanière/estivale dominée par la précipitation de carbonates (calcite bio-précipitée et diatomées, lamine claire, Figure 22) et la décantation automnale/hivernale de sédiments argileux et organiques (lamine sombre, Figure 22). L'absence d'oxygène durant la seconde période, dans les parties les plus profondes du Lac, permet une bonne conservation de la matière organique et une préservation de la structure laminée (absence de bioturbation). Les lamines sont présentes dans les sédiments jusqu'à une

vingtaine de centimètres de profondeur, ensuite une phase de transition est observée avec des lamines perturbées, mal définies pour enfin laisser place à une phase non laminée au delà de 20 cm de profondeur environ (Figure 22). Cette dernière phase est composée d'un mélange de particules carbonatées et détritiques (Giguët-Covex *et al.*, 2010).

La taille des particules sédimentaires est relativement homogène (Figure 23), avec une forte proportion de limons (environ 70%). Des sédiments plus sablonneux (taille > 63 μm) sont retrouvés plutôt dans des zones côtières proches d'affluents (sous le panache de la Leyse). La distribution des particules sédimentaires montre une forte proportion de particules carbonatées (Figure 23) notamment dans les zones centrales du Lac, dominées par une sédimentation autochtone.

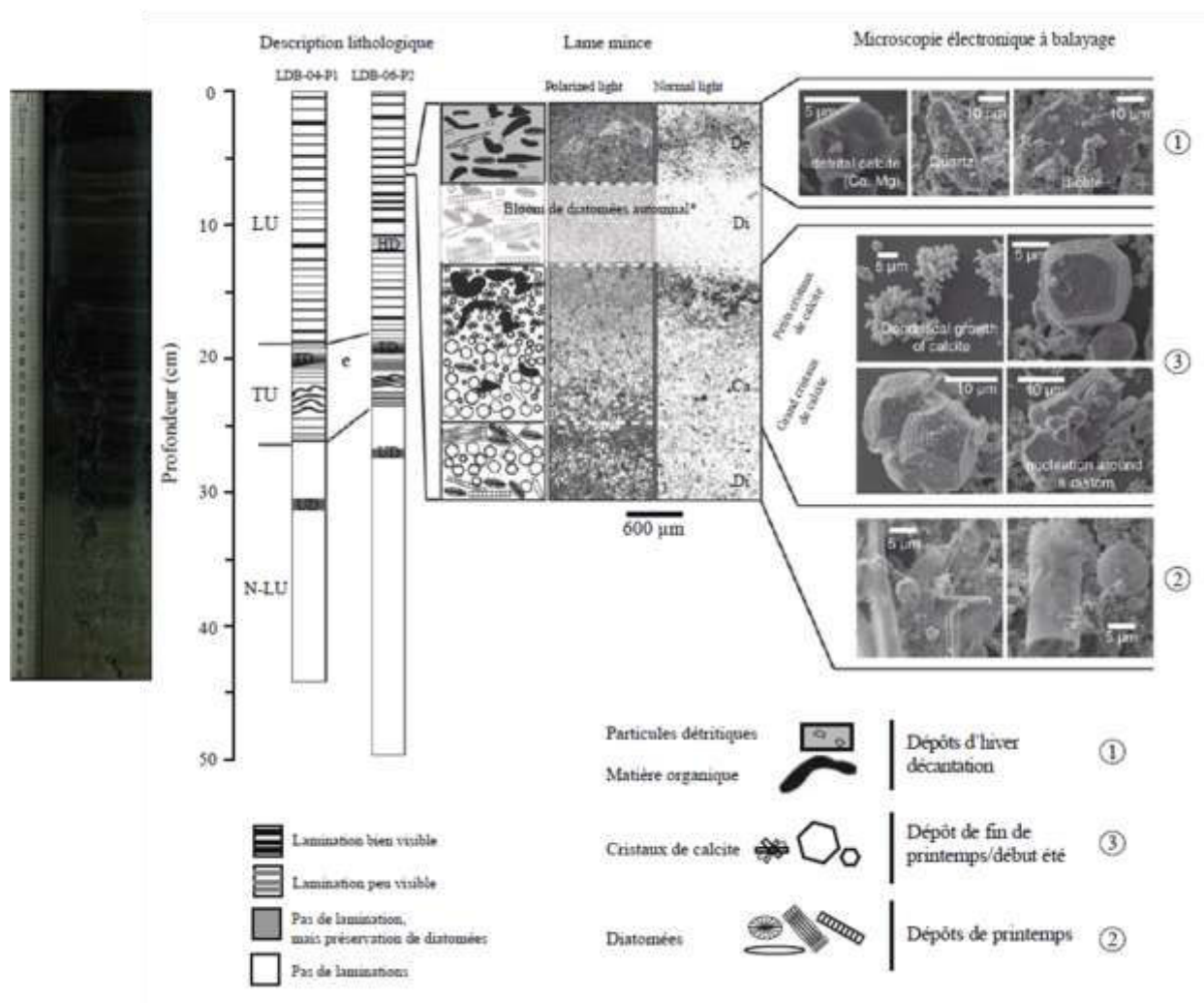


Figure 22 : A gauche illustration des lamines saisonnières (lamines claires et sombres) dans les sédiments du Lac du Bourget sur une carotte prélevée en mai 2011 à 110 m de profondeur. A droite, description macroscopique et microscopique des sédiments du Lac du Bourget d'après Giguët-Covex *et al.*, 2010. Abréviations : LU, unité laminée ; TU, unité de transition ; N-LU, unité non laminée ; HD, dépôt homogène ; TD, dépôt de turbidite ; UD, dépôt de crue ; De, couche détritique ; Ca, couche de calcite ; Di, couche de diatomée.

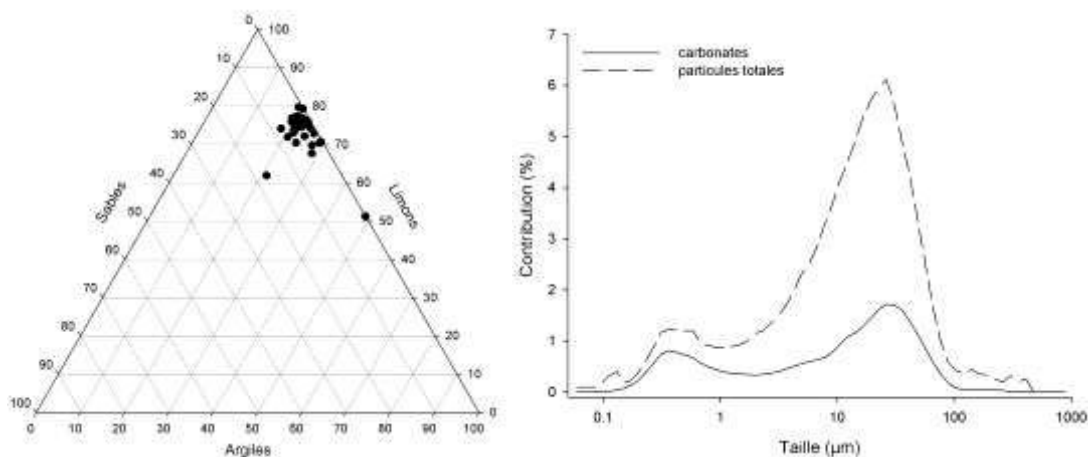


Figure 23 : A gauche, diagramme ternaire représentant les taux de sables, de limons et d'argiles dans les sédiments du Lac du Bourget. A droite, représentation de la distribution des tailles de particules sédimentaires totales (μm) et de la contribution des particules carbonatées.

Dans les sédiments du Lac du Bourget nous avons mesuré l'abondance procaryotique et virale, ainsi le nombre de procaryotes oscille entre 1.10^{10} et 1.10^{11} cellules procaryotiques/g de matière organique (MO) et le nombre de virus entre 1.10^{11} et 1.10^{12} cellules virale/g MO (Figure 24). L'abondance virale est supérieure d'environ 1 log à l'abondance procaryotique dans les sédiments du Lac du Bourget. Dans la verticalité (0–20 cm de profondeur) l'abondance procaryotique tend à diminuer avec la profondeur alors qu'il n'y a pas de tendance nette pour l'abondance virale (Figure 24). Le ratio entre l'abondance virale et l'abondance procaryotique (VPR) est de $21,9 \pm 13,2$ ce qui tend à montrer une forte pression virale sur les procaryotes dans les sédiments du Lac du Bourget (en comparaison le VPR dans les sédiments du lac Léman est de $11,8 \pm 8,3$).

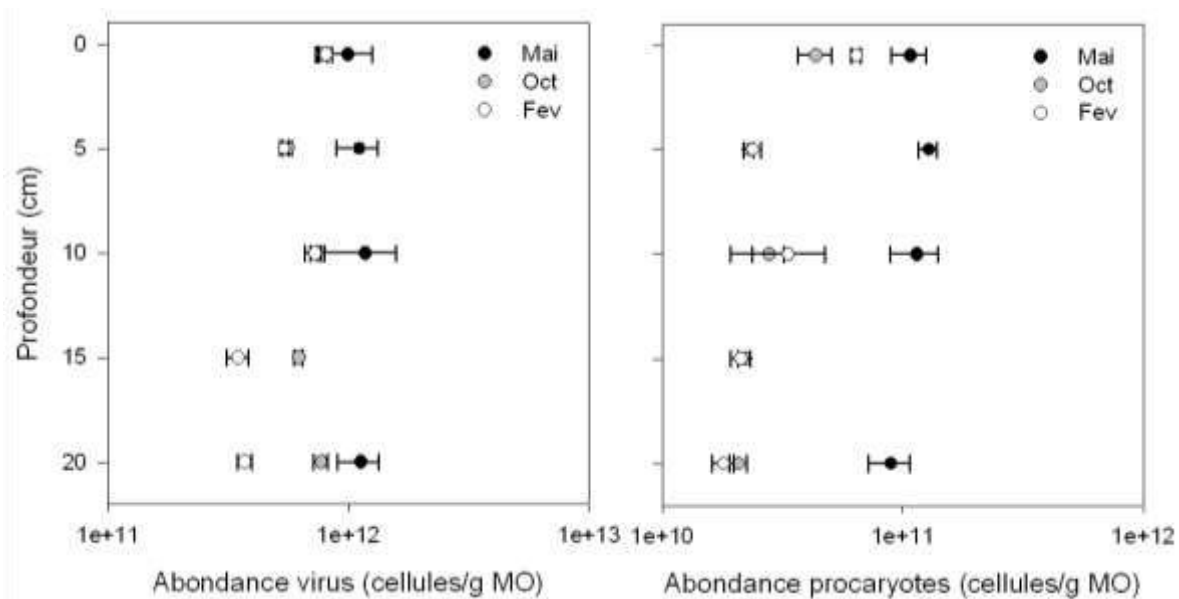


Figure 24 : Représentation de la variation temporelle des abondances virales (à gauche) et procaryotiques (à droite) en nombre de cellules par gramme de matière organique (MO) en fonction de la profondeur dans les sédiments (en cm) du Lac du Bourget. Les abondances sont représentées par des cercles noirs en mai 2011, par des cercles gris en octobre 2011 et par des cercles blancs en février 2012.

III. Echantillonnage et caractérisation des sédiments

Les prélèvements ont été réalisés soit à l'aide d'un multi-carottier (UWITEC) permettant de prélever plusieurs carottes simultanément, soit avec un carottier simple (UWITEC).

Des analyses physico-chimiques ont été réalisées sur chaque tranche de 1 cm, pour l'ensemble des carottes collectées, à savoir : une mesure du taux d'humidité, du taux de matière organique, du taux de carbonates, du taux de carbone (C) et d'azote (N) total et une analyse de la taille des particules sédimentaires.

1. Taux d'humidité

Les échantillons récoltés au sein de chaque carotte ont été séchés dans une étuve à 60°C pendant au moins 48h jusqu'à poids constant. La mesure du taux d'humidité a été réalisée selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'humidité} = [(P_1 - P_2) / (P_1 - P_0)] \times 100$$

P_0 = poids du contenant vide (g)

P_1 = poids du contenant vide + échantillon humide (g)

P_2 = poids du contenant vide + échantillon sec à 60°C (g)

2. Taux de matière organique et de carbonates

Les mesures des taux de matière organique et de carbonates ont été réalisées par perte au feu (*Loss on ignition*) d'après le protocole de Heiri *et al.*, 2001. Les échantillons séchés précédemment, ont été broyés dans des mortiers et pesés dans des nacelles en céramique. Celles-ci ayant été préalablement lavées à l'eau distillée et séchées 1 nuit à 105°C entre chaque utilisation afin d'éviter une transmission des particules sédimentaires entre les échantillons. Pour la mesure du taux de matière organique les échantillons ont été chauffés à 550°C pendant 4h, alors que pour la mesure du taux de carbonates ils l'ont été à 950°C pendant 2h. Le calcul du taux de matière organique dans les échantillons a été réalisé selon la formule suivante :

$$\text{Taux de matière organique} = [(P_4 - P_5) / (P_4 - P_3)] \times 100$$

P_3 = poids de la nacelle vide (g)

P_4 = poids de la nacelle vide + poids de l'échantillon sec (g)

P_5 = poids de la nacelle vide + poids de l'échantillon 550°C (g)

Le calcul du taux de carbonates dans les échantillons a été réalisé selon la formule suivante :

$$\text{Taux de carbonates} = [(P_5 - P_6) / (P_4 - P_3)] \times 100$$

P_6 = poids de la nacelle vide + poids de l'échantillon 950°C (g)

3. Taux de carbone et d'azote total

Les échantillons secs ont été broyés finement à l'aide de billes de tungstène dans un broyeur MA300 (30 Hz, 2 fois 30 sec, Retsch). Les échantillons ont ensuite été pesés à l'aide d'une balance de précision (≈ 20 mg) dans des capsules en étain (diamètre = 10 mm, h = 10

mm, volume = 785 μ L, Thermofisher). Les mesures de C et N total ont été réalisées par un analyseur élémentaire (Flash EA1112, ThermoFisher Scientific) sur la plateforme d'analyses environnementales au Laboratoire d'ECologie Alpine (LECA, UMR 5553). Les résultats sont exprimés en pourcentage du poids de sédiment sec. Le seuil de détection des composés étant de 0,01%.

4. Analyse de la taille des particules

La taille des particules sédimentaires a été mesurée à l'aide d'un granulomètre à diffraction laser (Malvern Mastersizer S) à partir des échantillons broyés précédemment (des tests ayant été effectués préalablement montrent qu'il n'y a pas de différence significative quant à la taille des particules entre échantillons broyés et non broyés). Pour chacun d'entre eux, 2 mesures ont été réalisées, la première à partir d'échantillons broyés et remis en suspension dans de l'eau déminéralisée afin d'obtenir la taille de toutes les particules sédimentaires, puis une seconde mesure pour laquelle de l'acide chlorhydrique (HCl) a été ajouté afin d'avoir la taille des particules non carbonatées. La taille et la distribution des particules carbonatées ont ensuite été calculées d'après Arnaud, 2005.

5. Analyses statistiques concernant les caractéristiques sédimentaires

Les paramètres physico-chimiques décrits précédemment ont été comparés au sein des stations, entre les stations et entre les dates échantillonnées en utilisant le test de Friedman avec le logiciel Statistica (Version 8.0, Statsoft). Les différences ont été considérées comme significatives à un seuil de 5%.

IV. Etude des communautés microbiennes benthiques

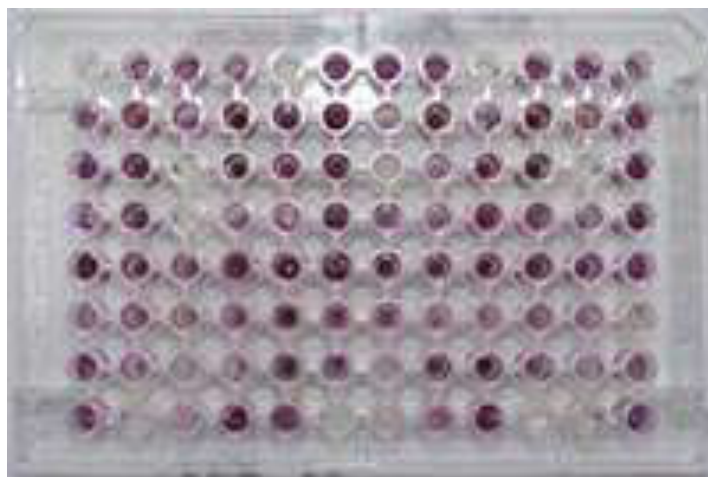
1. Mesure de l'abondance virale et procaryotique

L'abondance totale virale et procaryotique a été mesurée par cytométrie en flux (FACSCalibur flow cytometer, Becton Dickinson) à partir de 0,5 g de sédiment humide qui

ont été fixés dans 3 mL de formaldéhyde à 2%. Les échantillons ont ensuite été préparés et analysés comme décrit par Duhamel et Jacquet, (2006). Les mesures de l'abondance virale et procaryotique ont été réalisées à la station d'hydrobiologie lacustre de Thonon-les-Bains (par S. Jacquet).

2. Analyse de la composition phénotypique des communautés microbiennes benthiques

Afin d'évaluer, en première approche, la composition globale des communautés microbiennes benthiques, une analyse de la composition phénotypique (Biolog) a été réalisée à travers l'utilisation de différentes sources de carbone. Cette analyse a été réalisée sur la strate d'interface (0-1 cm) seulement, bien que des tests aient été effectués en anaérobiose (Freitag *et al.*, 2003) sur les strates plus profondes ils n'ont pas permis d'établir un suivi de la composition phénotypique des communautés microbiennes benthiques. L'analyse a été menée sur les carottes prélevées sur les 3 stations décrites précédemment en mai et octobre 2011 et février 2012 (8 échantillons au total). Pour cela, 1 g de sédiment humide a été dilué au 1/2000^{ème} dans un tampon PBS 1X (Phosphate Buffered Saline, Tampon phosphate Salin) et 150 µL ont été inoculés dans chaque puits (environ 1.10^6 cellules). Les microplaques Biolog ont été incubées jusqu'à 14 jours à 16°C. Ces microplaques contiennent 3 réplicats de 31 sources de carbone différentes (Figure 25), lorsqu'il y a oxydation de la source de carbone il y a réduction du tétrazolium ce qui produit une réaction colorée qui peut être suivie par mesure d'absorbance (Figure 25).



A1 Water	A2 β-Methyl-D-Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine	A1 Water	A2 β-Methyl-D-Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine	A1 Water	A2 β-Methyl-D-Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine
B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D-Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine	B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D-Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine	B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D-Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine
C1 Tween 40	C2 D-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L-Phenylalanine	C1 Tween 40	C2 D-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L-Phenylalanine	C1 Tween 40	C2 D-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L-Phenylalanine
D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine	D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine	D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine
E1 α-Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D-Glucosamine	E3 γ-Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine	E1 α-Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D-Glucosamine	E3 γ-Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine	E1 α-Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D-Glucosamine	E3 γ-Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine
F1 Glycogen	F2 D-Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L-Glutamic Acid	F1 Glycogen	F2 D-Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L-Glutamic Acid	F1 Glycogen	F2 D-Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L-Glutamic Acid
G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1-Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethylamine	G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1-Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethylamine	G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1-Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethylamine
H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α-Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine	H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α-Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine	H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α-Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine

Figure 25 : En haut, photographie illustrant la réaction de coloration lors de l'utilisation des sources carbonées. En bas, grille récapitulative des différentes sources de carbone testées avec l'EcoPlate Biolog.

L'analyse de la composition phénotypique des communautés microbiennes a été faite à partir des densités optiques (DO) mesurées à 590 nm. Chaque plaque contient un contrôle négatif pour chaque triplicat de sources carbonées (eau, Figure 25). La DO du contrôle négatif a été déduite des valeurs obtenues pour chaque source de carbone. Les valeurs négatives étant considérées comme égales à zéro. Chaque substrat est assimilé à une guildes en fonction de sa nature chimique (Choi & Dobbs, 1999). Il y a 6 guildes : polymères, carbohydrates, acides carboxyliques, acides aminés, amines et composés phénoliques. Toutefois, le nombre de

substrats par guildes n'est pas équivalent, il faut donc affecter un facteur correctif à la somme des DO de chaque guildes (x) (Leflaive *et al.*, 2005) :

$$S_x = \left(\frac{10}{n}\right) \cdot \sum_{i=1}^n DO$$

n = nombre de substrats de la guildes x

Pour pouvoir comparer les guildes au total de l'activité microbienne, le S_x obtenu précédemment est divisé par la somme des DO de la plaque. Ceci nous permet d'obtenir un pourcentage de l'activité microbienne, nommé P_x , (entre 0 et 1) par rapport à chaque guildes:

$$P_x = S_x / \sum_{i=1}^6 S_i$$

3. Extraction de l'ADN des sédiments

L'ADN des communautés microbiennes a été extrait à partir de 0,5 g de sédiments humides (conservés à -20°C entre l'ouverture de la carotte et l'extraction de l'ADN) à l'aide d'un kit d'extraction, NucleoSpin Soil (Macherey-Nagel) en suivant le protocole du fournisseur. Pour chaque échantillon, des réplicats d'extraction ont été réalisés : 2 réplicats pour l'analyse temporelle, 5 réplicats pour l'analyse spatiale (intra-carotte et intra-station) et jusqu'à 10 réplicats pour l'analyse spatiale interstation. De plus, pour l'analyse spatiale, des regroupements d'extraits d'ADN, dits « *pools* », ont été réalisés. Les *pools* ont été faits à partir du regroupement de 2 extraits d'ADN appartenant à la même strate au sein d'une carotte, ainsi 36 *pools* ont été réalisés.

4. Analyse de structure

L'analyse de la structure des communautés microbiennes benthiques a été réalisée par des méthodes d'empreintes moléculaires. Ces méthodes se basent sur un polymorphisme de

taille ou de séquence du gène d'intérêt qui permet de discriminer des organismes par leur « empreinte moléculaire » dite OTU (*Operational Taxonomic Units*). Ces méthodes génèrent des profils électrophorétiques après amplification PCR et migration sur électrophorèse capillaire (*Capillary Electrophoresis fingerprinting* - *CE-fingerprinting*). Les techniques d'empreintes moléculaires sont reproductibles et permettent d'accéder rapidement, à moindre coût, à la structure des communautés pour un grand nombre d'échantillons. Ces méthodes sont couramment utilisées pour l'analyse des communautés méthanogènes et méthanotrophes (Goffredi *et al.*, 2008 ; Ma & Lu, 2011 ; Barbier *et al.*, 2012 ; Daebeler *et al.*, 2013). Deux techniques d'empreintes moléculaires ont été utilisées, pour les bactéries : *Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis* (ARISA) et pour les archées, méthanogènes et méthanotrophes : *Terminal - Restriction Fragment Length Polymorphism* (T-RFLP).

L'ARISA consiste à amplifier les régions intergéniques (*Intergenic Spacer* - ITS) des différentes espèces présentes dans un échantillon entre l'ADNr 16S et l'ADNr 23S. Cette technique a été utilisée uniquement pour les bactéries car de nombreuses archées ne possèdent pas d'ITS (Leuko *et al.*, 2007). Pour l'amplification des ITS bactériens, les amorces S-D-Bact-1522-B-S-20 et L-D-Bact-132-a-A-1 (Normand *et al.*, 1996) ont été utilisées. L'amorce S-D-Bact-1522-B-S-20 ayant été préalablement marquée en 5' par 6-carboxyfluoresceine (6-FAM). Le protocole d'amplification est décrit dans le [Tableau 5](#) et le cycle d'amplification dans le [Tableau 6](#). Un contrôle positif, ADN d'une souche environnementale, a été utilisé afin de vérifier la spécificité des amplifications.

La T-RFLP consiste à amplifier un gène d'intérêt, ici l'ADNr 16S pour les archées, *mcrA* pour les méthanogènes et *pmoA* pour les méthanotrophes. Le polymorphisme de taille des différents gènes est obtenu après restriction enzymatique des amplifications. Pour les archées, l'amplification a été réalisée avec les amorces 5'- (6-FAM)-340f et 1000r (Gantner *et al.*, 2011). Ces amorces ont été choisies car elles amplifient à la fois les *Crenarchaeota* et les *Euryarchaeota* (Gantner *et al.*, 2011), ce qui permet d'étudier une plus grande diversité archéenne. De plus ces amorces ont été créées à partir d'échantillons environnementaux afin de pouvoir amplifier des organismes non cultivables. Pour les méthanogènes, l'amplification a été réalisée avec les amorces 5'- (6-FAM)-ME1 et ME2 (Hales *et al.*, 1996). Après différents tests d'amplifications avec d'autres couples d'amorces : MM_01 & MM_02 (Mihajlovski *et al.* 2008), MCRAf & MCRAr (Luton *et al.* 2002) et MCRf & MCRr (Springer *et al.* 1995), les amorces ME1 – ME2 nous ont permis d'obtenir des amplifications spécifiques des méthanogènes et de meilleurs rendements d'amplification. Pour les méthanotrophes,

l'amplification a été réalisée avec les amorces 5'- (6-FAM)-189f et mb661r (Costello & Lidstrom, 1999). Ces amorces ont été choisies d'après la littérature d'une part, car elles sont très couramment utilisées sur des échantillons environnementaux, en particulier dans les lacs, et après des tests d'amplification d'autre part. En effet, le couple d'amorce 189f - A650r (Bourne *et al.*, 2001) a aussi été testé mais les rendements d'amplification étaient plus faibles que ceux du couple 189f - mb661r. L'ensemble des protocoles d'amplification des 3 communautés microbiennes précédentes est décrit dans les **Tableaux 5** et **6**. La spécificité des amplifications de chaque communauté a été vérifiée à l'aide de contrôles positifs, les souches *Halobacterium salinarum* (Euryarchaeota, DSMZ 1616) et *Sulfolobus solfataricus* (Crenarchaeota, DSMZ 3754) pour les archées, *Methylomonas methanica* (DSMZ 25384) pour les méthanotrophes et pour les méthanogènes de l'ADN issus de boues de méthaniseur (fourni par Moletta méthanisation, Novalaise, France).

Tableau 5 : Protocoles des réactions d'amplification PCR des communautés bactériennes, archéennes, méthanogènes et méthanotrophes dans les sédiments du Lac du Bourget. Les concentrations de chaque réactif correspondent aux concentrations finales dans le milieu réactionnel.

	Bactéries	Archées	Méthanogènes	Méthanotrophes
Références	Lyautey <i>et al.</i> , 2011	Gantner <i>et al.</i> , 2011	Roussel <i>et al.</i> , 2009	Bourne <i>et al.</i> , 2001
Buffer	1 X	1 X	1 X	1 X
MgCl₂	1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM
BSA	0,3 mg.mL ⁻¹	0,4 mg.mL ⁻¹	0,3 mg.mL ⁻¹	0,3 mg.mL ⁻¹
DMSO	5%	/	/	/
Amorce F	0,5 µM	0,5 µM	0,5 µM	0,2 µM
Amorce R	0,5 µM	0,5 µM	0,5 µM	0,2 µM
dNTPs	0,2 mM	0,8 mM	0,8 mM	0,8 mM
Taq polymerase	0,25 U	0,8 U	1,5 U	2 U
ADN template	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng

Tableau 6 : Cycles d'amplifications PCR utilisés pour les communautés bactériennes, archéennes, méthanogènes et méthanotrophes. Pour chaque communauté, on trouvera la référence bibliographique de laquelle est tirée le protocole de base, ainsi que la température, le temps et le nombre de cycles pour chacune des étapes de la réaction.

	Bactéries			Archées			Méthanogènes			Méthanotrophes		
Références	Lyautey <i>et al.</i> , 2011			Gantner <i>et al.</i> , 2011			Roussel <i>et al.</i> , 2009			Bourne <i>et al.</i> , 2001		
	Température	Temps	Cycles	Température	Temps	Cycles	Température	Temps	Cycles	Température	Temps	Cycles
Dénaturation initiale	94°C	5 min	1	98°C	2 min	1	94°C	5 min	1	96°C	5 min	1
Dénaturation	94°C	1 min	35	95°C	30 sec	30	94°C	45 sec	30	94°C	1 min	30
Hybridation	55°C	1 min	35	60°C	30 sec	30	61°C	90 sec	30	61°C	1 min	30
Elongation	72°C	1 min	35	72°C	90 sec	30	75°C	2 min	30	72°C	1 min	30
Elongation finale	72°C	10 min	1	72°C	7 min	1	72°C	10 min	1	72°C	1 min	1

Les produits d'amplification des communautés fonctionnelles et totales ont été quantifiés sur gel d'agarose (Sigma - Aldrich) à 1,65 % avec un ladder 100 - 1000 bp (MassRuler™ Express LR Forward DNA Ladder, Fermentas). Les produits d'amplification (≈ 50 ng) pour la T-RFLP ont été digérés par 2,5 U d'enzyme de restriction AluI (Promega) pour les archées et MspI (Promega) pour les communautés fonctionnelles pendant 4 h à 37°C. L'ensemble des produits de restriction et des amplifications ARISA a été purifié avec un kit AxyPrep PCR Clean-up Kit (Axygen). Les fragments ont été séparés par un séquenceur ABI 3730xl (BIOfidal DTAMB, IFR 41, Université Claude Bernard Lyon 1) avec des capillaires d'une longueur de 50 cm durant 7000 secondes (environ 2 h) à une fréquence de 1,6 kV. Un standard interne a été ajouté à chaque échantillon, pour les bactéries et les méthanogènes le standard GeneScan 1200 LIZ (Applied Biosystems) a été utilisé et pour les archées et les méthanotrophes, le Dye 5 ladder, 50 - 1000 bp (Gel Company).

L'analyse des électrophorégrammes a été faite avec le logiciel *Peak Scanner* (Applied Biosystems). Tout d'abord, chaque plaque a été analysée indépendamment à partir d'un seuil de base déterminé à partir des témoins positifs afin d'obtenir le nombre de pics attendus sans avoir de pics parasites correspondant au bruit de fond. Ensuite, 3 microplaques ayant du être utilisées pour chaque communauté pour l'analyse de l'ensemble des échantillons, un protocole d'analyse a du être mis en place afin de ne pas biaiser les résultats par un possible « effet plaque ». Les témoins positifs étant les mêmes entre les plaques, pour une communauté donnée, les profils électrophorétiques obtenus sont donc similaires. Ainsi, en utilisant les différences de hauteur de pics entre les témoins positifs au sein de chaque plaque, un facteur de correction a pu être calculé pour chaque communauté. Le seuil de détection de la microplaque présentant le signal de fluorescence le plus faible, a alors été divisé par le facteur de correction calculé précédemment, permettant de diminuer son seuil de détection. Cette méthode a permis d'appliquer un seuil de détection proportionnel à l'intensité de fluorescence entre les plaques pour une même communauté, tout en conservant un maximum d'information, et ainsi de limiter « l'effet plaque » entre les échantillons. Pour finir, le bruit de fond a été éliminé. Détecter les OTU les plus abondantes n'est pas un problème car elles présentent des pics élevés sur les profils électrophorétiques. Toutefois, pour les OTU minoritaires on peut être confronté à des problèmes car l'intensité de ces OTU peut se situer au niveau ou en dessous de la limite de détection de la méthode. De plus, un seuil de détection (ou ligne de base) trop faible peut induire un bruit de fond et donc un biais dans l'analyse des données. Plusieurs méthodes existent pour discriminer le bruit de fond, la première se base sur

un calcul du pourcentage de contribution des pics constants (Sait *et al.*, 2003), la deuxième élimine le bruit de fond par un calcul basé sur l'intensité de fluorescence maximale (Dunbar *et al.*, 2000) et la dernière, appelée « *optimal divisor* » (Osborne *et al.*, 2006), définit la valeur du bruit de fond par une relation de proportionnalité entre la fluorescence totale d'un puits et le nombre de pics détectés dans celui-ci. C'est cette dernière méthode qui a été appliquée aux échantillons, avec un *optimal divisor* de 1/1000 (communautés totales) et 1/500 (communautés fonctionnelles). Ainsi pour chaque puits, les pics ayant une fluorescence inférieure à 1/1000^{ème} de la fluorescence totale du puits, pour les communautés totales et à 1/500^{ème} pour les communautés fonctionnelles, ont été supprimés du jeu de données car considérés comme du bruit de fond.

La taille des fragments a été bornée entre une taille maximale correspondant à la taille du fragment amplifié par les amorces (arrondi à la valeur la plus proche) et une taille minimale (basée sur la littérature) ainsi les fragments ont été bornés entre 35 et 640 pb pour les archées, entre 40 et 760 pb pour les méthanogènes et entre 50 et 510 pb pour les méthanotrophes. Pour les bactéries, la taille maximale des fragments est bornée par la limite analytique de la technique, soit 1200 pb, la taille minimale est de 160 pb (taille du fragment amplifié entre l'ADNr 16S et 23S quand l'intergène est absent). Les données ont ensuite été "binnées" (regroupées) à l'aide de *l'interactive binner script* (Ramette, 2009, <http://www.ecology-research.com>) sous R (R Development Core Team, 2014; <http://cran.r-project.org/>). Cette étape, dite *binning*, permet de regrouper des tailles de pics proches, issues des électrophorégrammes, à une même taille d'OTU. Le choix de la distance entre les pics proches est fonction des communautés et est déterminé par la « *window size* », c'est à dire une valeur optimale de la fenêtre qui est un compromis entre la résolution de l'analyse (WS faible = grand nombre d'OTU) et une similarité entre les profils (WS élevé = faible nombre d'OTU). Pour cette étude la *window size* a été de 1 pour les bactéries et de 2 pour les autres communautés. La résultante de cette étape est une synthèse des différentes OTU détectées dans chaque échantillon et leur intensité relative de fluorescence (RFI : *Relative Fluorescent Intensity*).

5. Analyse de la diversité

L'analyse de la diversité des communautés microbiennes fonctionnelles benthiques a été réalisée par clonage et séquençage de banques de clones. Quatre banques ont été construites, 1 pour les méthanogènes et 3 pour les méthanotrophes (1 banque par station). Pour la construction de ces banques, les échantillons ont été sélectionnés à partir des données acquises par génotypage (T-RFLP). L'ensemble des échantillons choisis permettait de recouvrir tous les T-RFs (fragments) obtenus par génotypage. Ainsi 13 échantillons ont permis de construire la banque de clones pour les méthanogènes, 8 échantillons pour la station 1, 6 pour la station 2 et 10 pour la station 3 pour les méthanotrophes.

L'amplification PCR des échantillons a été réalisée avec les mêmes protocoles que pour le génotypage (Tableaux 5 et 6). Les produits PCR ont été quantifiés sur gel d'agarose à 1,65% et mélangés en quantité équimolaire. Le *pool* des produits PCR a été purifié avec un kit NucleoSpin gel and PCR clean up (Macherey - Nagel) selon le protocole du fournisseur. Le *pool* des produits PCR a été quantifié avec un kit QuantiFluor dsDNA System (Promega) par fluorimétrie (Plate Chameleon fluorometer, Hidex) à une longueur d'onde d'excitation de 495 nm et une longueur d'onde d'émission à 590 nm.

Les produits PCR *poolés*, purifiés et quantifiés ont ensuite été clonés à l'aide du pGEM-T Easy Vector Systems (Promega) selon le protocole fourni avec le kit. On notera cependant 2 modifications :

- ratio molaire *Insert:Vecteur* : a été modifié à 8:1 pour les méthanogènes et 3:1 pour les méthanotrophes.
- temps de ligation : a été doublé, passant à 2 h pour les 2 communautés.

Les colonies transformées (blanches) ont été isolées (2 fois) sur gélose LB (*Luria Bertoni*) et la présence de l'insert a été vérifiée par PCR en utilisant les amorces SP6 / T7. Les clones contenant un insert ont été séquencés par Macrogen Inc. (Amsterdam, Pays Bas) à partir de l'amorce SP6.

6. Analyse d'abondance des communautés méthanogènes et méthanotrophes dans les sédiments

L'analyse de l'abondance des communautés méthanogènes et méthanotrophes a été réalisée par PCR quantitative (qPCR) à partir des gènes de fonction *mcrA* et *pmoA*. Chaque amplification a été réalisée en triplicat. La réaction d'amplification a été réalisée dans 25 µL et

contenant, 1X de qPCR MasterMix Plus for SYBRGreen I Low ROX (Eurogentec), 0,3 mg.mL⁻¹ de BSA (Sigma-Aldrich), 0,5 µM de chaque amorce (Eurogentec) et 1 µL d'ADN. Les cycles d'amplifications des 2 communautés sont présentés dans le [Tableau 7](#). Afin de réaliser une gamme étalon, une solution de plasmide contenant le gène d'intérêt a été réalisée. Pour cela, les témoins positifs méthanogènes (clone avec insert *mcrA*, identifié à 97% comme étant *Méthanosarcina thermophila*) et méthanotrophes (clone de la souche DSMZ 25384) ont été amplifiés, quantifiés et clonés. Les clones ayant l'insert ont été mis en culture dans 50 mL de milieu LB à 37°C sous agitation pendant une nuit. Les plasmides contenus dans la culture ont été extraits avec le kit NucleoSpin plasmid (Macherey Nagel), conformément au protocole fourni. Les plasmides extraits ont ensuite été linéarisés par restriction enzymatique (Sall, Promega), purifiés et quantifiés. Le nombre de copies de plasmides contenus dans l'extrait a été calculé et a permis de créer une solution mère d'ADN plasmidique à 10⁹ copies.µL⁻¹. Des dilutions en cascade de 10 en 10 ont été réalisées afin de faire une gamme étalon comprise entre 10⁹ et 10¹ copies.µL⁻¹. Cette gamme étalon a permis de quantifier le nombre de copies de chacun des gènes étudiés dans les échantillons. Pour *mcrA*, on trouve une seule copie du gène par cellule, alors que pour les méthanotrophes, il y a 2 copies du gène *pmoA* par cellule (Stolyar *et al.*, 1999). La gamme étalon a aussi permis de déterminer l'efficacité de la réaction d'amplification, pour *mcrA* une efficacité de 93% a été obtenue et une efficacité de 99% pour *pmoA*.

Tableau 7 : Cycles d'amplification en qPCR pour les communautés méthanogènes et méthanotrophes. Pour chaque communauté les températures, les durées et le nombre de cycles utilisés pour chaque étape sont indiqués.

	Méthanogènes			Méthanotrophes		
	Température	Temps	Cycles	Température	Temps	Cycles
Dénaturation initiale	95°C	10 min	1	95°C	10 min	1
Dénaturation	94°C	45 sec	40	94°C	45 sec	45
Hybridation	52°C	90 sec	40	60°C	60 sec	45
Elongation	72°C	2 min	40	72°C	90 sec	45
Acquisition	80°C	10 sec	1	80°C	10 sec	1
Courbe de dissociation	30°C – 95°C	30 sec	1	30°C – 95°C	30 sec	1

7. Analyses statistiques concernant les communautés microbiennes

La composition phénotypique des communautés microbiennes a été analysée par analyse en composantes principales (ACP) avec le logiciel R (ADE4 package, Dray & Dufour, 2007). L'utilisation des différentes sources carbonnées a été représentée par un diagramme en étoile à l'aide du logiciel Excel comme suggéré dans les travaux de Pommier *et al.* (2014).

Pour l'analyse de l'hétérogénéité spatiale de la structure des communautés microbiennes benthiques à multi-échelle, une matrice de présence / absence a été exportée après *binning*. A partir de celle-ci, une matrice de distance de Jaccard a été réalisée et représentée sous forme d'un nMDS (non Multi-Dimensional Scaling, Clarke & Warwick, 2001) avec le logiciel R (Vegan package, Oksanen *et al.*, 2013). La significativité et l'amplitude des différences entre les groupes, définis *a priori*, ont été déterminées par une analyse de similarité (ANOSIM, logiciel R, Vegan package). L'ANOSIM a été réalisée à partir de la matrice de Jaccard avec une permutation aléatoire de 10 000 tests. Les groupes ont été considérés comme significativement différents à un seuil de 5% après correction de Bonferroni (logiciel R, stats package). Afin d'explorer les relations entre les paramètres environnementaux et la structure des communautés microbiennes, une analyse de redondance (RDA) a été effectuée (logiciel R, ADE4 package, Dray & Dufour, 2007) avec un test de Monte Carlo (1 000 permutations). Pour évaluer les relations entre les communautés totales et fonctionnelles, une analyse procrustéenne a été réalisée (PROTEST logiciel, Jackson, 1995). La représentation graphique des analyses procrustéennes a été réalisée avec le logiciel R. Enfin, pour montrer la répartition des OTU entre les strates et les stations, des diagrammes de Venn ont été réalisés à partir de l'outil en ligne suivant : <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html> (Oliveros, 2007).

Pour l'analyse de la variabilité temporelle de la structure des communautés fonctionnelles, une matrice d'abondance a été exportée après *binning*, puis une matrice de similarité Bray-Curtis a été réalisée et représentée sous forme d'un nMDS. La significativité et l'amplitude des différences entre les groupes, définis *a priori*, ont été déterminés par une ANOSIM qui a été réalisée à partir de la matrice de Bray-Curtis avec une permutation aléatoire de 10 000 tests. Les groupes ont été considérés comme significativement différents à un seuil de 5% après correction de Bonferroni (logiciel R, stats package). Afin d'identifier la contribution des différentes OTU aux variations temporelles une analyse SIMPER (SIMilarity

PERcentage) a été faite avec le logiciel Past (Hammer *et al.*, 2001) à partir de la matrice de similarité de Bray-Curtis. Enfin, pour identifier les relations entre la structure des communautés microbiennes et les paramètres environnementaux des analyses de redondances (RDA) ont été effectuées avec le logiciel R (package ade4, Dray & Dufour, 2007).

Pour l'analyse de la diversité, les séquences ont été nettoyées (amorces SP6, *mcrA*, *pmoA* et la séquence du site de clonage multiple ont été retirées) avec le logiciel *BioEdit Sequence Alignment Editor* (Hall, 1999). Après avoir supprimé les chimères à partir de la plateforme *Functional Gene Pipeline and Repository* (FunGene, Fish *et al.*, 2013), 132 séquences pour les méthanogènes et 232 pour les méthanotrophes ont été analysées. A partir d'un seuil à 95% pour *mcrA* (Daebeler *et al.*, 2013) et à 93% pour *pmoA* (Degelmann *et al.*, 2010) les séquences ont été regroupées en unité opérationnelle taxonomique (OTU) à l'aide du logiciel DOTUR (Schloss P. & Handelsman J., 2005). Pour chaque communauté un arbre phylogénétique a été réalisé à partir des séquences représentatives des OTU à l'aide du logiciel MEGA (version 6, Tamura *et al.*, 2013) en utilisant la méthode de *Neighbor-Joining*. Un test de bootstrap avec 1 000 permutations a été réalisé. Enfin les clones ont été digérés *in silico* avec le logiciel TRiFLe (Junier *et al.*, 2008) afin d'identifier les fragments de T-RFLP théoriques.

Chapitre III

—

Etude de la variabilité spatiale des communautés microbiennes benthiques à multi - échelle

Avant propos

Dans ce chapitre, sont présentés les données ayant trait à l'analyse de la variabilité spatiale des communautés microbiennes benthiques totales et fonctionnelles. Ce travail a fait l'objet d'un article publié dans la revue *Hydrobiologia* (Billard *et al.*, 2015, vol 751: 159-173).

Lors de la rédaction de cet article, la construction de banques de clones, en vue de déterminer la diversité des communautés fonctionnelles benthiques dans le lac du Bourget était en cours. Les données de séquençage des banques de clones n'avaient donc pas été incluses dans le manuscrit soumis à *Hydrobiologia*, mais leur analyse nous a semblé apporter une information complémentaire à celle des travaux publiés. Ces données sont présentées à la fin de ce chapitre.

I. Introduction

L'objectif de cette étude a été d'analyser l'hétérogénéité et la variabilité spatiale, à différentes échelles, de la structure des communautés microbiennes benthiques totales (bactéries et archées) et fonctionnelles (méthanogènes et méthanotrophes) dans le Lac du Bourget. Tout d'abord, afin de tester la pertinence de *pooler* les extraits ADN avant les analyses de génotypage, une analyse comparative de la structure et de la richesse (nombre d'OTU détectées) des communautés microbiennes a été effectuée entre des échantillons *poolés* (extraits d'ADN regroupés 2 par 2) et des échantillons analysés individuellement (échantillons individuels ayant servis à faire les *pools*).

L'hétérogénéité des communautés microbiennes totales et fonctionnelles a été évaluée au sein de chaque strate sédimentaire (niveau d'hétérogénéité intra-carotte *via* l'analyse de 5 réplicats par strate), pour des carottes différentes prélevées au sein d'une même station (niveau d'hétérogénéité intra-station *via* la comparaison entre 3 carottes) et le long d'un

transect de distance (niveau d'hétérogénéité inter-station *via* l'étude de 3 stations d'échantillonnage).

Ces analyses comparatives à l'échelle horizontale ont par ailleurs été effectuées de manière croisée avec la variabilité verticale en étudiant 3 strates sédimentaires différentes le long des carottes (inter-strates).

Enfin les résultats relatifs à la structure des communautés ont été mis en lien avec les paramètres environnementaux susceptibles de modifier la structure des communautés microbiennes benthiques.

Cette étude s'appuie sur l'analyse de marqueurs phylogénétiques (ITS pour les bactéries et ADNr 16S pour les archées) pour les communautés totales et sur celle de gènes fonctionnels ciblés pour les méthanogènes (*mcrA*) et les méthanotrophes (*pmoA*). Deux techniques de génotypage ont été utilisées, à savoir l'ARISA pour les bactéries et la T-RFLP pour les autres communautés.

II. Résultats

L'étude comparative entre les *pools* et les échantillons individuels montre que pour 3 des 4 communautés microbiennes étudiées, un nombre d'OTU significativement plus faible dans les *pools* est détecté, avec un nombre moyen d'OTU (\pm écart-type) par pool de 45 ± 4 OTU pour les bactéries, 10 ± 2 OTU pour les archées et 4 ± 1 OTU pour les méthanogènes contre 50 ± 3 , 12 ± 2 et 5 ± 1 OTU dans les échantillons individuels. Seul le nombre d'OTU des méthanotrophes ne présente pas de différence significative entre *pools* et échantillons individuels (6 ± 1 OTU). Pour les communautés totales, les OTU présentes dans les échantillons individuels mais non retrouvées dans les *pools*, sont majoritairement (91% pour les bactéries et 62% pour les archées) des OTU dont l'intensité de fluorescence relative (RFI) est inférieure à 1% (OTU rare). Toutefois, aucune différence significative n'est observée entre les *pools* et les échantillons individuels pour la structure des communautés.

En ce qui concerne le nombre d'OTU détectées, une augmentation de l'hétérogénéité est observée en fonction de l'échelle spatiale horizontale : l'hétérogénéité intra-carotte est modérée en comparaison de celle observée au niveau de l'intra-station. Les coefficients de

variation (CV \pm SD) estimés pour la richesse varient du niveau intra-carotte au niveau intra-station en passant de 10 ± 4 à $14 \pm 5\%$ pour les bactéries, de 10 ± 11 à $24 \pm 6\%$ pour les archées, de 22 ± 12 à $31 \pm 5\%$ pour les méthanotrophes et de 22 ± 10 à $30 \pm 7\%$ pour les méthanogènes.

De même, alors qu'il n'est pas détecté de différence significative de la structure des communautés microbiennes benthiques entre les carottes d'une même station, ce niveau d'hétérogénéité augmente pour les comparaisons effectuées au niveau spatial horizontal supérieur. Pour les bactéries, le CV passe de 9 ± 4 à $13 \pm 4\%$ de l'intra-carotte vers l'intra-station, pour les archées de 31 ± 11 à $33 \pm 5\%$, de 28 ± 12 à $30 \pm 6\%$ pour les méthanotrophes et de 33 ± 13 à $39 \pm 8\%$ pour les méthanogènes.

Le nombre total d'OTU détectées est de 185 pour les bactéries, 63 pour les archées, 15 pour les méthanotrophes et 11 pour les méthanogènes. A l'échelle horizontale, la proportion d'OTU communes aux 3 stations est de 12% pour les bactéries, 14% pour les archées, 40% pour les méthanotrophes et 55% pour les méthanogènes. Pour l'ensemble des communautés microbiennes une différence significative de la structure est observée entre les 3 stations ($p < 0,001$ pour les bactéries et les archées, $p < 0,005$ pour les méthanotrophes et $p < 0,03$ pour les méthanogènes).

L'analyse de la variabilité verticale montre que pour les bactéries $37 \pm 5\%$ des OTU sont communes aux 3 strates, une proportion similaire est observée pour les archées ($37 \pm 11\%$), on atteint $43 \pm 18\%$ et $53 \pm 12\%$ respectivement pour les méthanogènes et les méthanotrophes. Toutefois, lorsque l'on compare la structure des communautés entre les 3 strates sédimentaires pour chacune des stations, seules les bactéries montrent une structure significativement différente entre les 3 strates ($p < 0,001$). Pour les autres communautés, seule la strate de surface (0-1 cm), est significativement différente des autres strates ($p < 0,001$ pour les archées, $p < 0,005$ pour les méthanotrophes et $p < 0,01$ pour les méthanogènes).

Afin d'évaluer la contribution des paramètres environnementaux sur la structure des communautés microbiennes dans le Lac du Bourget une analyse de redondance a été réalisée. Seule la taille médiane des particules sédimentaires explique significativement les variations de structure des 4 communautés microbiennes entre les 3 stations ($p < 0,001$ pour les communautés totales et $p < 0,05$ pour les communautés fonctionnelles). Les taux de carbonates et de carbone total expliquent significativement les variations de structure observées chez les bactéries ($p < 0,001$) et les communautés fonctionnelles ($p < 0,05$). La

saturation en oxygène à l'interface eau-sédiment explique les variations de structure observées chez les communautés totales ($p < 0,001$) et méthanogènes ($p < 0,05$). Les taux d'humidité et d'azote total sont explicatifs de la structure des bactéries uniquement ($p < 0,001$) et la matière organique de celle des méthanogènes ($p < 0,001$).

III. Discussion

Les données acquises confirment la nécessité d'intégrer, dans les études écosystémiques, différentes échelles spatiales pour l'étude des communautés microbiennes benthiques. L'hétérogénéité spatiale horizontale des communautés augmente de l'intra-carotte vers l'intra-station, confirmant d'autres études sur les sédiments (Bowen *et al.*, 2012; Jacob *et al.*, 2013; Tsertova *et al.*, 2013), sans affecter significativement la structure des différentes communautés microbiennes. Ceci peut être expliqué par une variabilité relativement faible des conditions environnementales à micro-échelle (niveau intra-carotte) voire à l'échelle d'une station. Toutefois, avec des méthodes ayant une résolution plus fine, des changements de structure en intra-station pourraient être visibles, notamment pour les communautés totales. L'analyse comparative sur "l'effet de *pool*" montre une perte d'OTU dans les échantillons *poolés*, perte qui est due d'une part à un effet de dilution dans les *pools* et d'autre part à la sensibilité de la méthode qui masque les OTU rares (Bowen *et al.*, 2012; Gobet *et al.*, 2013) la faible résolution du génotypage permettant de détecter principalement des OTU dominantes (Gilbert *et al.*, 2009 ; Bienhold *et al.*, 2012).

La structure des communautés microbiennes totales montre une variabilité spatiale à la fois horizontale (niveau inter-stations) et verticale (niveau inter-strate). A l'échelle horizontale, les 2 communautés montrent un changement de structure entre les stations, mais à l'échelle verticale seules les bactéries ont une structure significativement différente entre chaque strate sédimentaire, les archées ayant uniquement une structure différente entre la strate de surface (0-1 cm) et les strates profondes (Ye *et al.*, 2009 ; Swan *et al.*, 2010). Comme précédemment rapporté par d'autres études les bactéries et les archées ont des préférences écologiques différentes, de fait elles ne sont pas influencées par les mêmes conditions environnementales (Liu *et al.*, 2009 ; Ye *et al.*, 2009). De plus, les *Crenarchaeota*

et les *Euryarchaeota* peuvent avoir des T-RF identiques masquant une partie de la structure des archées et donc une partie de la variabilité. Ce biais n'est pas à exclure dans notre analyse. L'analyse de redondance montre que la structure de la communauté bactérienne est influencée par un plus grand nombre de paramètres environnementaux que la communauté archéenne. Pour les bactéries, tous les paramètres, sauf le taux de matière organique, ont un effet significatif sur la structure de cette communauté alors que pour les archées seules, la taille des particules et la saturation en oxygène montrent un effet significatif. Nos résultats confirment d'autres études ayant permis de corréliser la diversité bactérienne à de nombreux facteurs environnementaux tels que le pH, la matière organique, les taux de carbone et d'azote totaux et la porosité (Docherty *et al.*, 2006 ; Liu *et al.*, 2009 ; Hollister *et al.*, 2010 ; Swan *et al.*, 2010). Bien que le taux de matière organique ne soit pas corrélé avec les communautés totales dans notre étude, il est possible que la qualité de la matière organique soit un paramètre structurant ces communautés (Docherty *et al.*, 2006), en particulier du fait de la localisation de nos stations d'échantillonnage (soumises ou non aux apports de matière organique de la Leyse). Les apports de matières organiques allochtones d'un côté et autochtone d'un autre, pourraient être un paramètre explicatif des différences de structure des communautés totales entre les stations.

A l'échelle verticale, les 2 communautés fonctionnelles changent significativement de structure entre la strate de surface et les strates plus profondes. Pour la méthanotrophie l'oxygène est une nécessité (Borrel *et al.*, 2011), toutefois les méthanotrophes peuvent survivre en conditions anaérobies (Roslev & King, 1996). En revanche leur détection *via* l'ADN, dans les strates profondes anoxiques, nécessite des travaux complémentaires afin de savoir s'il s'agit de communautés viables ou d'ADN préservé dans les sédiments suite à l'enfouissement de communautés microbiennes anciennes comme cela peut être le cas notamment pour les méthanogènes (Belle *et al.*, 2014). Concernant les méthanogènes, l'absence d'oxygène est un pré-requis pour leurs activités (Borrel *et al.*, 2011), par conséquent leur présence dans la strate d'interface sur les stations oxygénées pose question. Toutefois, la stratégie d'échantillonnage mise en œuvre, notamment pour la strate d'interface (strate de 1 cm), et de récentes études sur la présence de méthanogènes en conditions oxygénées (Angel *et al.*, 2011 ; Grossart *et al.*, 2011 ; Tang *et al.*, 2014) permettent d'émettre des hypothèses quant à leur présence en conditions aérobies. A l'échelle horizontale, les communautés fonctionnelles montrent un changement significatif de structure entre les stations. L'analyse de redondance montre que la structure des 2 communautés est influencée par plusieurs

paramètres environnementaux (taux de carbone total, de carbonates et taille des particules sédimentaires). Pour les méthanogènes, la matière organique et la saturation en oxygène sont aussi des paramètres expliquant en partie les changements de structure de cette communauté. Ces variations de conditions environnementales entre les différentes stations peuvent être une explication aux variations horizontales de la structure des méthanogènes et des méthanotrophes (Biderre-Petit *et al.*, 2011 ; Deutzman *et al.*, 2011).

En conclusion, ce travail a permis de démontrer les variations spatiales de structure des communautés microbiennes benthiques totales et fonctionnelles dans la verticalité (en lien avec de possibles changements de condition d'oxydoréduction) et sur l'horizontalité (transect de distance entre le principal affluent du Lac et la zone la plus profonde). L'analyse comparative, entre *pools* et échantillons individuels a montré que ces derniers permettaient d'obtenir un plus grand nombre d'OTU, favorisant l'étude de la structure des communautés microbiennes. L'étude de l'hétérogénéité a permis d'évaluer qu'une seule carotte par station était suffisante pour l'analyse de la structure. Enfin, l'étude de la variabilité a montré que des conditions environnementales contrastées influençaient la structure des communautés microbiennes. Toutefois une analyse un peu plus détaillée dans la verticalité (strates intermédiaires entre 1–9 cm et 11–19 cm) pourrait être intéressante de même que l'intégration d'une échelle temporelle (en lien avec la stratification lacustre) afin de gagner en compréhension sur ces communautés.

IV. Article & Données complémentaires

Multi-scale phylogenetic heterogeneity of archaea, bacteria, methanogens and methanotrophs in lake sediments

Elodie Billard · Isabelle Domaizon ·
 Nathalie Tissot · Fabien Arnaud · Emilie Lyautey

Received: 11 July 2014 / Revised: 5 January 2015 / Accepted: 13 January 2015 / Published online: 1 February 2015
 © Springer International Publishing Switzerland 2015

Abstract Understanding spatial microbial community variation is necessary to assess diversity patterns. In this study, we investigated spatial heterogeneity and variability of functional and total microbial benthic community structures in Lake Bourget, France. Community structure variability was determined vertically by comparing three sediment layers per core, and horizontally at the intra-site level (between up to three cores per sites) and between three sites. Bacterial, archaeal, methanotrophs and methanogens community structures were assessed by genotyping the 16S rRNA–23S rRNA intergenic spacer, 16S rRNA, *pmoA*

and *mcrA* genes, respectively. The consequence of pooling DNA extracts before genotyping was tested. After pooling, the OTU number decreased for all communities, but it had no effect on structure. At the core scale, bacterial community structure significantly differed between the sediment layers, but archaeal, methanogens and methanotrophs community structures only differed significantly between the superficial and deeper layers. Changes in environmental conditions affected microbial community structures between sites (sediment carbonates, total carbon contents, median particle sizes, and water O₂ saturation), but not intra-site, as no significant changes were observed at the horizontal scale. These spatial scales should be considered to understand their importance for biogeochemical cycle when assessing benthic microbial community structure and diversity in lakes.

Handling editor: Stefano Amalfitano

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10750-015-2184-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

E. Billard · N. Tissot · E. Lyautey
 Université de Savoie, CARRTEL, 73000 Chambéry,
 France

I. Domaizon
 INRA, CARRTEL, 74200 Thonon-les-Bains, France

F. Arnaud
 CNRS, EDYTEM, 73000 Chambéry, France

E. Lyautey (✉)
 UMR 42 CARRTEL, Centre de Recherche sur les
 Réseaux Trophiques et Ecosystèmes Limniques,
 Université de Savoie, 73376 Le Bourget du Lac, France
 e-mail: emilie.lyautey@univ-savoie.fr

Keywords Spatial distribution · Microbial diversity · Freshwater sediment · Methanotrophy · Methanogenesis

Introduction

Microorganisms are involved in the different biogeochemical cycles due to their metabolic activities (Fenchel et al., 1998; Madsen, 2011). In aquatic ecosystems, the benthic compartment represents a key area where microbes play crucial roles in the global

carbon cycle by releasing CO₂ and/or CH₄ into the atmosphere via decomposing organic material stored in sediments (Conrad, 1996; Paerl & Steppe, 2003; Schultz & Urban, 2008). Methanogenesis final product, methane, is an important greenhouse gas whose atmospheric concentration has doubled during the twentieth century (IPCC, 2007). Sediments are subjected to a strong redox gradient, and they become rapidly anoxic and favour methanogenesis as the final step of organic matter mineralization (Chaudhary et al., 2013). Methane produced in sediment is emitted to the water column and atmosphere by diffusion or bubbling, and it can be oxidized to carbon dioxide under favourable conditions (Krause et al., 2010). The net amount of methane released into the atmosphere is the result of the methanogenesis–methanotrophy activity equilibrium, and freshwater sediments contribute to up to 40–50% of the annual methane emission (Chaudhary et al., 2013). Archaea are responsible for methanogenesis under anoxic conditions (Garrity & Holt, 2001), whereas methanotrophy is generally carried out by bacteria under oxic conditions (Conrad, 2009), except for the anaerobic oxidation of methane (AOM), which is carried out by methanogenic archaea (Reeburgh, 2007; Knittel & Boetius, 2009; Crowe et al., 2011). Eukaryotes (amoebae, flagellates and ciliates) also play a key role in methane turnover and emission at the oxic/anoxic interface through the grazing of methanotrophic organisms (Murse & Frenzel, 2007).

Prior to the holistic study of an ecosystem, the scales of variability in the distribution of targeted communities must be determined to evaluate how common the diversity patterns are across space (Tšertova et al., 2013). Molecular methods targeting phylogenetic or functional gene markers allow for the efficient investigation of microorganism diversity. For instance, methanogens and methanotrophs diversity is relatively well known, but their distribution in freshwater sediment and their controlling environmental parameters are still under investigation (Deutzmann et al., 2011; Nolla-Ardèvol et al., 2012). The benthic compartment is very heterogeneous, resulting in variability and patchiness in microbial community composition at the horizontal, vertical and even temporal scales. Moreover, the dynamics of water column characteristics (e.g. nutrients and organic matter concentrations) are likely to generate spatial

and temporal heterogeneities for the sediments (Trolle et al., 2009).

Understanding the benthic microbial community structure and distribution, including specific functional communities, in lakes for which this knowledge is scarce, is an important challenge for sedimentary systems research. The present study aimed to gain insight into the spatial heterogeneity of microbial communities in the superficial sediment (0–20 cm) of Lake Bourget, considering total (bacteria and archaea) and functional (methanogens and methanotrophs) communities. In particular, we focused on potential horizontal variations in the microbial communities within sediments by considering 3 sites selected along a transect gradient from the main lake tributary to the deepest part of the lake. The specific objectives of this study were as follows: (i) analyse community structure heterogeneity at various horizontal scales: the intra-core scale, site scale and inter-site scale, considering the vertical distribution of microbial communities within sediment cores, (ii) investigate co-structuration between total and functional microbial communities.

Materials and methods

Study site and core collection

Lake Bourget is the largest natural lake in France (44.5 km², 18 km long and 3.4 km wide), with a maximum depth of 147 m and a watershed area of 560 km². Its major tributary is the river Leyse (Jacquet et al., 2012). Sample collection was carried out in December 2011 at three sampling sites: site 1 (E 5°52'6.77"–N 45°39'46.91") is 65 m deep and located within the Leyse river plume, site 2 (E 5°52'11.55"–N 45°40'57.41") is 110 m deep and located outside of the Leyse river plume and site 3 (E 5°51'37.10"–N 45°44'43.60") is the deepest point of Lake Bourget (147 m) (Fig. 1). At sites 1 and 2, three replicate cores (C1, C2 and C3) were collected using a gravity multicorer (UWITEC, Mondsee, Austria). At site 3, due to windy conditions, only one core (C1) was sampled using a gravity corer (UWITEC, Mondsee, Austria). Water column temperature and dissolved oxygen profiles were carried out using a multiparameter probe (SBE 19+, Sea-Bird Electronics Inc., Washington, USA).

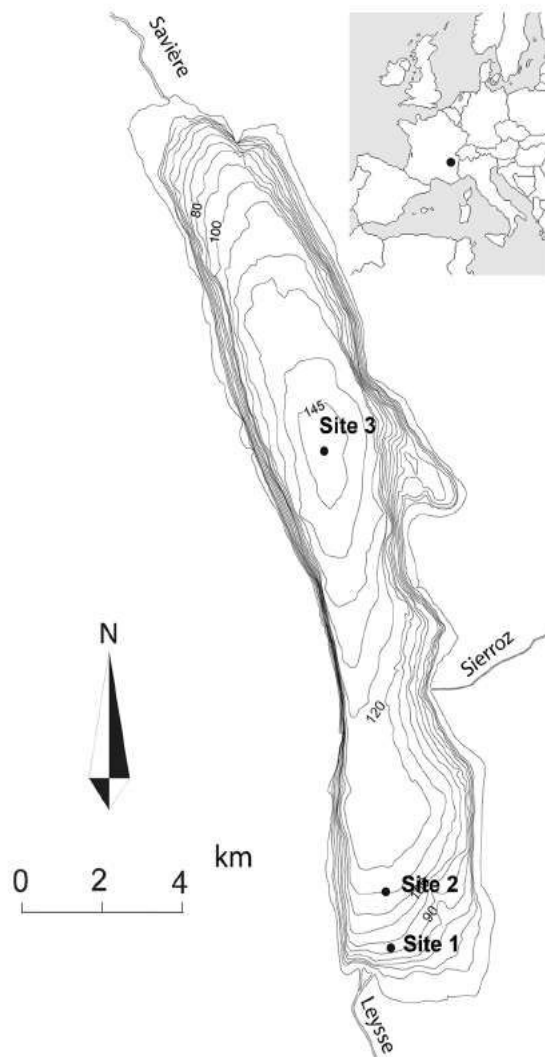


Fig. 1 Map showing the location of Lake Bourget and of sampling sites. Site 1 (E 5°52'6.77"–N 45°39'46.91") is 65 m deep, site 2 (E 5°52'11.55"–N 45°40'57.41") is 110 m deep, and site 3 (E 5°51'37.10"–N 45°44'43.60") is the deepest point of Lake Bourget (147 m)

Sediment sample characterization

Sediment was sectioned into 1 cm slices at three depths (0–1 cm, 9–10 cm and 19–20 cm) to select contrasted redox conditions (Brandl et al., 1993). For each sediment layers, the centre of the section was sampled for DNA analysis and stored at -20°C . Sediment particle size distribution was determined by laser diffraction on dry sediments (Mastersizer S, Malvern, United Kingdom) and particles were grouped by the median particle grain size. The water

content of the sediment was estimated by drying at 60°C for 48 h. Organic matter and carbonate contents were measured by loss on ignition (Heiri et al., 2001). Total carbon and total nitrogen were determined using an elementary analyzer (Flash EA1112, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA, Plateforme Analyses Environnementales, UMR 5553 LECA).

Total and functional microbial community structures from sedimentary DNA

DNA was extracted from 0.5 g of wet sediment using a NucleoSpin Soil kit (Macherey–Nagel EURL, Hoerd, France), according to the manufacturer's protocol. For Lake Bourget sediment, DNA was extracted using SL1 lysis buffer and additive Enhancer SX buffer. The extracted DNA was quantified fluorometrically after staining with bisBenzimide (DNA Quantitation Kit, Fluorescence Assay, Sigma-Aldrich, St Louis, USA) using a Plate Chameleon fluorometer (Hidex, Turku, Finland; excitation: 340 nm, emission: 460 nm).

For core C1 from sites 1, 2 and 3, a total of ten replicates sub-samples were extracted for each of the three sediment layers, and the samples were genotyped to assess total and functional community structure variability at the inter-site scale (Fig. 2). The replicates from C1 cores were also used to study the consequence of pooling DNA extracts before amplification on total and functional community structures using the following procedure: DNA extracts of each sediment layer and site were pooled 2 by 2; a total of 36 pools were constituted (Fig. 2). For some samples ($n = 8$), there was not sufficient DNA to use for the pool analyses, preventing the realization of the four remaining pooled samples. More information on reproducibility of the genotyping techniques used is available in the supplementary information.

For cores C2 and C3 (sites 1 and 2 only), five replicate sub-samples per sediment layer were extracted and analysed. These samples, together with five replicates from the cores C1, were used to assess intra-site heterogeneity by comparing the results obtained for the 3 different cores originating for the same site (site 1 and site 2; Fig. 2).

Microbial community structures were assessed using two fingerprinting methods, providing peak profiles after capillary electrophoresis (CE) resolution of PCR-amplified phylogenetic or functional gene markers. Automated ribosomal intergenic spacer analysis

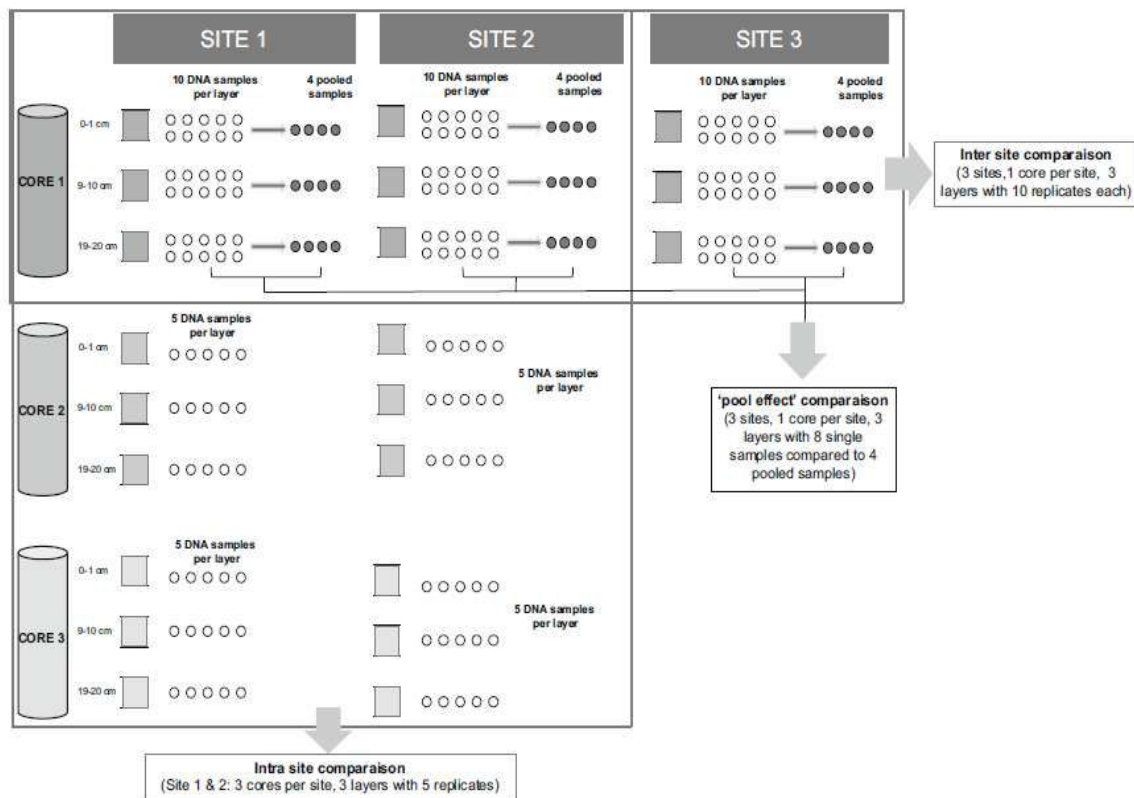


Fig. 2 Sampling design to compare the pooling effect (*black line*) benthic microbial community richness and structure, and their spatial variability of intra-sites (core 1, 2 and 3 for site 1 and 2, *grey dotted line*) and between sites (site 1, 2 and 3, *grey line*)

(ARISA) is based on the length polymorphism of intergenic spacer (ITS) sequences between 16S and 23S rRNA genes. Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) is based on the digestion of the total (16S rRNA gene) or functional (here *mcrA* and *pmoA* genes) gene marker following PCR amplification with a fluorescently labelled primer, so only the terminal-restriction fragment (T-RF) can be CE-resolved. ARISA was used for bacteria and T-RFLP was used for archaea (16S rRNA gene), because most archaea do not have intergenic spacers (Leuko et al., 2007). Functional microbial community structures were studied using T-RFLP analyses of two genes: *mcrA* (methyl coenzyme M reductase), which is involved in methanogenesis (Lueders & Friedrich, 2003) and *pmoA* (particulate methane monooxygenase), which is involved in methanotrophy (Costello & Lidstrom, 1999).

ITS were amplified using 5'-6-carboxyfluorescein (FAM)-labelled-S-D-Bact-1522-B-S-20 and L-D-Bact-132-a-A-18 (Normand et al., 1996) primers with 10 ng of template DNA and using a previously described

protocol (Lyautey et al., 2011). Archaeal 16S rRNA gene was amplified using 5'-6-FAM-labelled-340f and 1000r primers (Gantner et al., 2011) according to the authors' protocol, with slight modifications: the $MgCl_2$ concentration in the reaction mix was 1.5 mM and the hybridization temperature was increased to 60°C and 10 ng of extracted DNA was used as template. Functional genes were amplified using 10 ng of extracted DNA, using 5'-6-FAM-labelled-A189f and mb661r primers as described elsewhere (Bourne et al., 2001) for *pmoA* except that hybridization temperature was increased to 61°C, and using 5'-6-FAM-labelled-ME1 and ME2 primers (Hales et al., 1996) for *mcrA* as described previously (Roussel et al., 2009); however, the hybridization temperature was increased to 61°C. For each targeted gene, a positive control was used to verify amplification specificity (bacteria: DNA from an environmental isolate, archaea: *Halobacterium salinarum* (DSMZ 1616) and *Sulfolobus solfataricus* (DSMZ 3754) strains, methanotrophs: *Methylomonas methanica* (DSMZ 25384) strain and methanogens: DNA

from a methanization digester sludge). Amplification products were quantified on a 1.65% agarose gel using a MassRuler™ Express LR Forward DNA Ladder (Fermentas, Waltham, USA). For T-RFLP analyses, 50 ng of amplified DNA was digested with AluI (Promega Corporation, Madison, USA) for archaea 16S rRNA gene and MspI (Promega Corporation, Madison, USA) for *mcrA* and *pmoA* genes, for 4 h at 37°C. Restriction products and ARISA amplification products were purified using a AxyPrep PCR Clean-up Kit (Axygen, Tewksbury, USA) and separated on ABI 3730xl DNA Analyzer (BIOfidal DTAMB, IFR 41, Université Claude Bernard Lyon 1) using the internal size standard, GeneScan 1200 LIZ (Applied Biosystems, Waltham, USA) for bacteria intergenic spacer and *mcrA*, and Dye 5 ladder, 50–1000 bp (Gel company, San Francisco, USA), for archaea 16S rRNA gene and *pmoA*.

Data analysis

Physical and chemical parameters were compared (between sites and within sites) using Friedman test for all parameters, except for particle sizes, for which no data were available for site 3 samples. Site 1 and site 2 particle sizes data were compared using Wilcoxon test. All statistical tests were performed using Statistica software (Version 8.0, Statsoft, Inc., Tulsa, USA), and differences were considered significant at the 5% level.

T-RFLP and ARISA electropherograms were analysed using Applied Biosystems Peak Scanner software. Because two microplates per genes were needed to analyse the entire sample set, the threshold applied to each microplate was adjusted to minimize plate effects; internal standard peak heights were compared between plates, and a correction factor was calculated based on height differences. The correction factor was applied to samples that presented a low fluorescence signal, and the threshold from each well was divided by the correction factor. Samples with peak heights below the plate detection threshold were individually and manually adjusted. Fragments (T-RF or intergenic spacer) smaller than 160 bp for bacteria, 35 bp for archaea, 40 bp for *mcrA* and 50 bp for *pmoA* were considered as noise and were excluded from the analyses. Data were binned (i.e., electrophoretic profiles alignment) using the interactive binner script (Ramette, 2009) available online (<http://www.ecology-research.com>) and implemented using the R programming

language (R Development Core Team, 2014; <http://cran.r-project.org/>) with $WS = 1$ for bacteria and $WS = 2$ for others, $Sh = 1$ and an optimal divisor value of 1/1,000 (total communities) and 1/500 (functional communities). Peaks were scored as present or absent, and the data were exported as a presence/absence matrix. For pooled samples, a theoretical OTU number was computed from the profiles obtained from individual samples used in each pool, and then observed versus theoretic OTU number were compared using Wilcoxon test.

For all communities and pooled samples, profile similarity was computed using the Jaccard similarity index, and distances were represented by non-multi-dimensional scaling (nMDS, Clarke & Warwick, 2001) with R software (Vegan package, Oksanen et al., 2013). Significant differences between groups were determined from the nMDS plots, and ANalysis Of SIMilarity (ANOSIM, R software, Vegan package) was used to test significant differences between the following user-defined (a priori) groups: the intra-core scale between the three studied sediment layers, the intra-site scale between the three cores collected per site (site 1 and 2 only) and the inter-site scale between the three studied sites. ANOSIM was computed from the Jaccard similarity matrix, and a random permutation test (10,000 permutations) was applied. The test was considered significant at $P < 0.05$ after application of the Bonferroni correction (R software, stats package, $p.adjust$, <http://cran.r-project.org/>).

Redundancy analyses (RDA) were used to explore the relationships between environmental parameters and community structure variations. RDA was performed using R software (ade4 package, Dray & Dufour, 2007) with 1,000 Monte Carlo permutation tests.

Venn diagrams were used to enumerate shared or unique OTU between layers or sites. Diagrams were made using the online tool provided at the following web address: <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html> (Oliveros, 2007).

The relationships between total and functional community structures were evaluated using the Procrustean analysis (PROTEST software package—PROcrustean randomization test; <http://labs.eeb.utoronto.ca/jackson/pro1.html>). Procrustean analyses superimpose, scale and rotate one data matrix upon the other until an optimal fit is found (Jackson & Harvey, 1993; Peres-Neto & Jackson, 2001; Heino et al., 2004). Estimated residuals

between the original values and the derived best-fit solution give the $m12$ statistic: a low $m12$ value indicates good correspondence between data matrices (Paavola et al., 2006). The PROTEST permutation procedure (10,000 permutations) was used to assess the statistical significance of the Procrustean fit between the two matrices (Peres-Neto & Jackson, 2001; Paavola et al., 2006).

Results

Study sites characterization

At the water–sediment interface, the temperatures were 5.8, 5.5 and 5.5°C, and the oxygen saturation rates were 63, 61 and 0%, at sites 1, 2 and 3, respectively. Based on the physical–chemical parameters measured in the sediments (Table 1), no intra-site difference was observed between cores C1, C2 and C3 collected at site 1 or 2 (Friedman test, $P > 0.05$ for all tested parameters). At the core scale, water content for site 1 ($P = 0.049$) and organic matter content for site 2 ($P = 0.049$) were significantly different between each layer. Between sites 1, 2 and 3 (as assessed based on comparing 1 core only per site), the water content significantly (Friedman test, $P = 0.049$) increased from $59 \pm 5\%$ (site 1) to $66 \pm 4\%$ (site 2) to $76 \pm 6\%$ (site 3). Particle sizes was significantly different between sites 1 and 2 (Wilcoxon test, $P = 0.021$), with a median grain size of $20 \pm 3 \mu\text{m}$ at site 1 and $15 \pm 3 \mu\text{m}$ at site 2. No significant differences were observed between the 3 sites for the other parameters (organic matter, carbonates, total nitrogen and total carbon contents, Friedman test, $P > 0.05$).

Effect of DNA extracts pooling on OTU number and structure

The bacterial, archaeal and methanogen OTU numbers between the pooled and single (non-pooled) samples were significantly different (Wilcoxon test, $P < 0.005$), with mean OTU number (\pm SD) of 45 ± 4 , 10 ± 2 and 4 ± 1 OTUs per pools and of 50 ± 3 , 12 ± 2 and 5 ± 1 OTUs per single sample, respectively. For methanotrophs, no significant difference was observed (Wilcoxon test, $P > 0.05$), with 6 ± 1 OTUs for both pooled and single samples. The OTUs lost by pooling exhibited a relative fluorescent intensity (RFI) $< 1\%$

(representing 91 and 62% of the “lost” OTUs for bacteria and archaea, respectively). No significant difference was observed between the community structures of pooled and single samples for total and functional communities within each site (see Fig. S1, ANOSIM, $P > 0.05$ for all cases).

Intra-site OTU number and structure heterogeneity

Structure and OTU number heterogeneity were assessed at the site scale within cores (five replicate samples from 1 cm sediment layers) and between cores (three cores for sites 1 and 2 only) (Fig. 2). Both for OTU number (Table S1) and for structure (Table S2) heterogeneity (as assessed by calculating $\text{CV} \pm \text{SD}$) was less important within cores compared to within sites (between cores of the same site) for the four studied communities (bacteria, archaea, methanotrophs and methanogens). No significant difference was observed within sites (site 1 or 2) for total (bacterial and archaeal) or functional (methanotrophs and methanogens) community structures between the three cores (ANOSIM, 10,000 permutations, $P > 0.05$ in all cases).

OTU number estimation and vertical and horizontal structure of communities

The total and functional community structure was assessed in the verticality of the sediment (across layers) and horizontally between sites. For bacteria, 185 distinct OTUs were detected (Table S3), $37 \pm 5\%$ were common between the three studied layers and $12 \pm 3\%$ were layer-specific. A total of 12% of the OTUs were common to the three sites, whereas 58% were site-specific (equally distributed in the 3 sites; Fig. 3A). For archaea, 63 distinct OTUs were detected (Table S4). On average, $37 \pm 11\%$ of the OTUs were shared between the three studied layers, and $15 \pm 7\%$ of the OTUs were layer-specific. Fourteen percent of the OTUs were common to the 3 sites, whereas 66% were site-specific (distributed as follows: 19% in site 1, 22% in site 3, and 25% in site 2; Fig. 3B). For methanotrophs, among the 15 distinct OTUs (Table S5), $53 \pm 12\%$ were shared between the three studied layers and $12 \pm 12\%$ were layer-specific. Forty percent of the OTU were common to the three sites, whereas a small number of OTUs were site-specific (27% Fig. 3C). For methanogen

Table 1 Physical and chemical description of Lake Bourget sediment for cores from sites 1, 2, and 3 (cores C1–C3 for sites 1 and 2, and core C1 for site 3)

Site	Layer (cm)	Core	Water content (%)	Organic matter (%)	Carbonates (%)	Median particle size (μm)	TN (%)	TC (%)
1	0–1	C1	60.73	8.24	24.71	17.62	0.24	9.92
		C2	62.58	8.51	24.33	18.18	0.25	9.71
		C3	62.80	5.45	16.03	16.93	0.25	9.77
		Mean \pm SD	62.03 \pm 1.14	7.40 \pm 1.69	21.69 \pm 4.91	17.58 \pm 0.63	0.24 \pm 0.01	9.80 \pm 0.11
	9–10	C1	44.61	7.48	18.50	24.88	0.12	7.59
		C2	45.98	7.03	21.00	26.04	0.12	7.97
		C3	53.13	7.27	22.60	16.34	0.14	8.14
		Mean \pm SD	47.09 \pm 4.57	7.26 \pm 0.23	20.70 \pm 2.07	22.42 \pm 5.30	0.13 \pm 0.01	7.90 \pm 0.28
	19–20	C1	55.93	7.79	22.66	22.61	0.19	9.48
		C2	57.53	8.84	24.75	21.97	0.20	9.50
		C3	59.56	7.84	24.55	18.89	0.21	9.22
		Mean \pm SD	57.68 \pm 1.82	8.15 \pm 0.59	23.99 \pm 1.15	21.16 \pm 1.99	0.20 \pm 0.01	9.40 \pm 0.16
2	0–1	C1	70.67	8.56	27.83	18.51	0.33	11.45
		C2	67.57	10.24	20.23	13.45	0.24	8.54
		C3	70.08	9.11	26.99	17.18	0.35	11.32
		Mean \pm SD	69.44 \pm 1.65	9.30 \pm 0.86	25.01 \pm 4.17	16.38 \pm 2.63	0.31 \pm 0.06	10.44 \pm 1.64
	9–10	C1	62.58	7.79	22.99	13.56	0.22	8.97
		C2	63.79	8.22	26.79	17.7	0.23	10.03
		C3	62.26	8.23	26.03	14.25	0.23	9.69
		Mean \pm SD	62.88 \pm 0.81	8.08 \pm 0.25	25.27 \pm 2.01	15.17 \pm 2.22	0.23 \pm 0.01	9.56 \pm 0.54
	19–20	C1	64.02	7.09	27.43	14.47	0.24	10.00
		C2	59.80	7.98	26.23	11.37	0.16	9.34
		C3	65.00	7.52	29.43	17.49	0.20	10.40
		Mean \pm SD	62.94 \pm 2.76	7.53 \pm 0.45	27.70 \pm 1.62	14.44 \pm 3.06	0.20 \pm 0.04	9.92 \pm 0.53
3	0–1	C1	82.83	9.31	27.49	NA	NA	NA
	9–10	C1	74.33	8.06	23.12	NA	0.25	9.40
	19–20	C1	71.50	8.50	28.39	17.03	0.38	10.97

Sediments from the 0–1 cm, 9–10 cm and 19–20 cm layers within cores were characterized for water content (%), organic matter content [% Dry Weigh (DW)], carbonates content (% DW), median particle size (μm), total nitrogen content (TN, % DW), and total carbon content (TC, % DW)

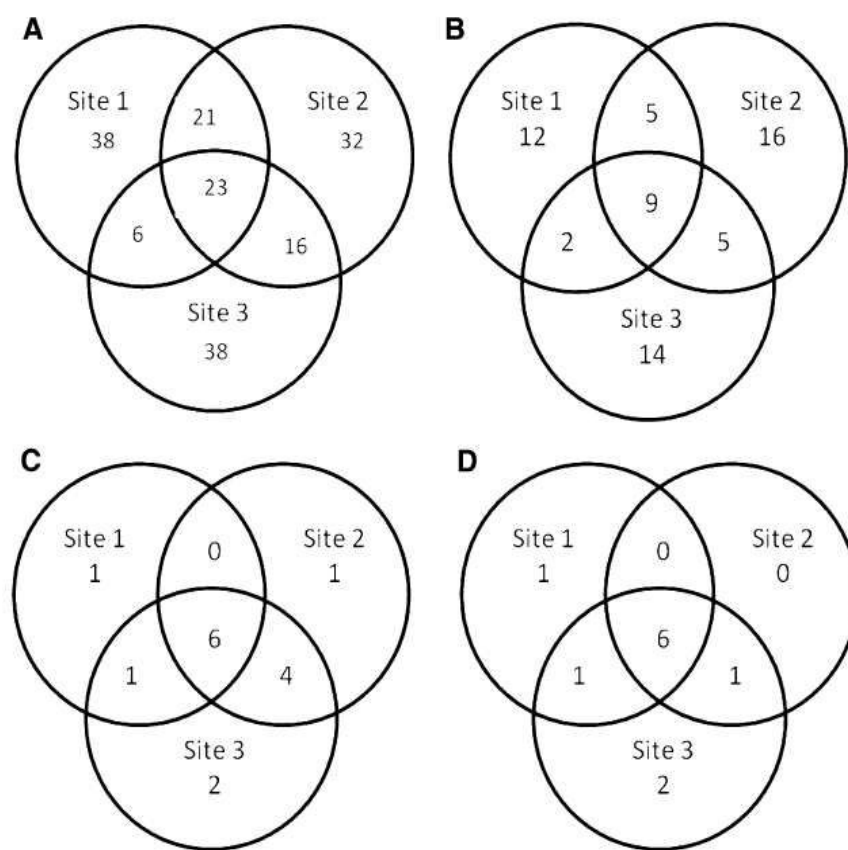
NA no data available

community, 11 distinct OTUs were detected (Table S6), $43 \pm 18\%$ were shared between the three studied layers and $10 \pm 10\%$ were layer-specific. Fifty-five percent of the OTUs were common to the three sites, and a small number were site-specific (27% in total; Fig. 3D).

Regarding the community structure, significant differences were observed between total and functional communities between the three sites (Fig. 4, ANOSIM, 10,000 permutations, $P < 0.001$, $R = 0.86$; $P < 0.001$, $R = 0.46$; $P < 0.005$, $R = 0.38$ and $P < 0.03$, $R = 0.29$ for bacteria, archaea, methanotrophs and

methanogens, respectively). For bacteria, the community structure was significantly different between the three layers (ANOSIM, 10,000 permutations, $P < 0.001$, $R = 0.82$). For archaea, methanotrophs and methanogens, the community structures within the cores were only significantly different in the surface layer versus deeper layers (9–10 and 19–20 cm) (ANOSIM, 10,000 permutations, $P < 0.001$, $R = 0.18$; $P < 0.005$, $R = 0.32$; and $P < 0.01$, $R = 0.27$, respectively). For all of the combinations tested (functional versus functional, total versus total or total versus functional), significant levels of concordance were

Fig. 3 Repartition of shared or unique OTU between sites (Venn diagram, Oliveros, 2007) for each microbial community: bacteria (A), archaea (B), methanotrophs (C) and methanogens (D)



observed between microbial community structures (Procrustean analysis, two-dimensional representations not shown, $P < 0.001$ in all cases, Table 2).

Relationship between environmental parameters and community structures

The relationships between environmental parameters (from the water at the sediment interface and from sediment samples, as listed in Table 3) and microbial communities were explored by RDA. For the bacterial community structure, every parameter except the sediment organic matter content significantly explained the observed changes between sites ($P < 0.001$, Table 3). For archaea, only the median particle sizes and water O_2 saturation could explain changes in the community structure ($P < 0.001$, Table 3). For both methanogens and methanotrophs, the carbonate, total carbon contents, and median particle sizes, were significantly related with community structures (Table 3). The methanogens community structure was also significantly related to

water O_2 saturation and sediment organic matter content.

Discussion

The main objective of this study was to investigate the spatial heterogeneity and variability of total and functional benthic microbial communities in a lacustrine environment using genotyping approaches (ARISA and T-RFLP). These approaches are widely used to characterize microbial community structure spatial and temporal changes (Schwarz et al., 2007; Deutzmann et al., 2011; Barbier et al., 2012), and T-RFLP can theoretically be used to affiliate T-RFs size and microbial taxa (TRiFLe software, Junier et al., 2008). Using this software, half of the detected T-RFs in the present work were related to the *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, *Methanococcales* and *Methanobacteriales* orders for methanogens, and the *Methylococcaceae*, *Methylocystaceae* and *Methylacidiphilaceae* families for

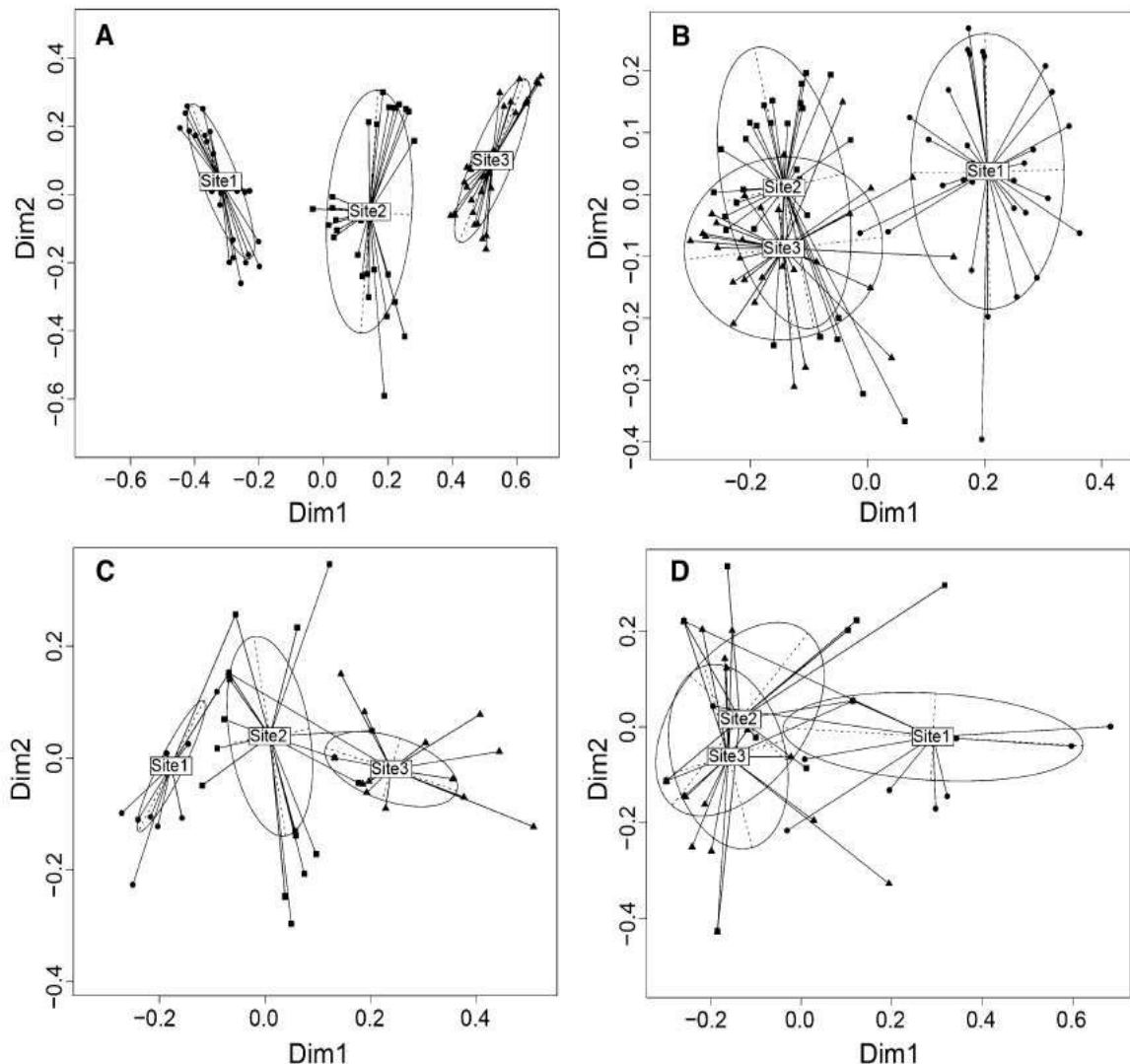


Fig. 4 nMDS representation of distances between bacterial (A, stress = 0.15), archaeal (B, stress = 0.36), methanotrophs (C, stress = 0.27) and methanogens (D, stress = 0.35)

communities based on Jaccard similarity analysis (Site 1 black circle, Site 2 black square, Site 3 black triangle)

methanotrophs. These results are in accordance with other freshwater sediment-related literature, which recovered the same taxa (Borrel et al., 2011). However, further investigations (i.e., cloning and sequencing) are required here to identify the remaining T-RFs. Genotyping is a rapid and inexpensive tool for the analysis of a large number of samples. However, compared to next generation sequencing (NGS) techniques, the low resolution of genotyping prevents the detection of the rare biosphere (Gilbert et al., 2009; Bienhold et al., 2012; Jacob et al., 2013), but it still allows for the comparison of ecological trends (Gobet et al., 2014).

Consequently, this approach is perfectly suited to assess microbial community heterogeneity at different spatial scales.

At the site scale, the total and functional community structure heterogeneities increased from the intra- to the inter-core (i.e., intra-site) scale, confirming previous observations (Bowen et al., 2012; Jacob et al., 2013; Tšertova et al., 2013). At the micro-scale (sample replicates within 1-cm sediment layers), the occurrence of comparable physical and chemical conditions likely explains the observed similarity between community structures, especially because

Table 2 Procrustean analysis results between community 1 and 2 as indicated

Community 1	Community 2	<i>m12</i>	<i>P</i>
Bacteria	Archaea	0.596	<0.001
Bacteria	Methanotrophs	0.517	<0.001
Bacteria	Methanogens	0.843	<0.001
Archaea	Methanotrophs	0.693	<0.001
Archaea	Methanogens	0.876	<0.001
Methanotrophs	Methanogens	0.897	<0.001

The statistical significance of the test for 10,000 permutations is indicated by the *P* value, and *m12* is a statistic indicator for the level of correspondence between the data matrixes (Jackson, 1995; Peres-Neto & Jackson, 2001)

genotyping approaches allowed for the detection of only intermediate to dominant populations. Pooling DNA extracts prior to genotyping total or functional microbial communities significantly decreased the observed OTU number, likely due to both method sensitivity and dilution effect, which both mask rare OTUs (Bowen et al., 2012; Gobet et al. 2014). The parallel analysis of several replicates was more powerful for analysing microbial community structure and OTU number, improving the richness estimation (Canning-Clode et al., 2008), and this approach will be considered for future works. For benthic microbial communities, ecological niche diversification occurs at the millimeter scale (Priscu et al., 1998; Nam et al., 2008), and it locally controls benthic prokaryotic communities (Bertics & Ziebis, 2009). As expected, niche differentiation was more important for microbial community structures vertically (in depth within cores) than horizontally (between the same layers of cores collected at a same site). Several authors have

reported the predominant role of sediment grain size on prokaryotic community structures (Hewson et al., 2007; Jackson & Weeks, 2008). Within cores, microbial community structures differed between layers according to their distance to the water column–sediment interface. This trait was common for bacteria and archaea (Edlund et al., 2008; Ye et al., 2009; Shivaji et al., 2011), as well as for methanogens and methanotrophs (Barbier et al., 2012; Borrel et al., 2012). Sediments are vertically stratified by the redox gradient (Fenchel & Finlay, 1995), controlling microbial metabolism and diversity. Here, we found that the community structure for bacteria was significantly different for each studied sediment layer. However, this was not the case for archaea, methanotrophs or methanogens. Swan et al. (2010) reported a similar trend hypothesizing prokaryotic communities that have different ecological requirements. They also highlighted that the T-RFs of many *Crenarchaeota* sequences are identical to those of the *Euryarchaeota*, potentially masking community structure changes. Different primers were used to amplify the archaeal 16S rRNA gene in the present study, and a resolution bias cannot be completely excluded from our approach.

For methane cycling micro-organisms, the community structure differences observed between the surface layer and the deeper layers are consistent with their ecological requirements. Methanotrophs are divided into 2 types depending on their morphological, physiological and ecological properties. Both types are frequently detected in freshwater sediments (Rahalkar et al., 2009; Biderre-Petit et al., 2011; Deutzmann et al., 2011). Several studies have suggested that type I methanotrophs (*Methylococcaceae*) may be more

Table 3 Redundancy analysis (RDA) performed to estimate environmental effects on spatial variability of community structures

Parameters	Bacteria	Archaea	Methanotrophs	Methanogens
Water content	4.45***	−1.68	1.65	1.40
Organic matter	−0.99	−0.66	−0.46	−4.09***
Carbonates	4.18***	−1.07	2.06*	2.42*
Median particles size	8.93***	−3.335***	2.22*	2.18*
Total nitrogen	3.41***	−1.29	1.43	1.50
Total carbon	−4.39***	1.93	−2.15*	−3.00**
O ₂ saturation	−6.51***	5.80***	−1.04	2.83*

For each community, *t* values were indicated, bold shown the significance

Significance levels are indicated as *** *P* < 0.001; ** *P* < 0.01; * *P* < 0.05

adaptable to changing environmental conditions such as methane and oxygen variations (Auman et al., 2000; Semrau et al., 2010; Ma et al., 2013). As previously suggested (Borrel et al., 2011), this might explain the dominance of type I methanotrophs in freshwater sediment which is a heterogeneous habitat. Methane and oxygen availability are important requirement for methanotrophy but methanotrophs can remain in a viable state under anaerobic conditions: they were still able to carry out methane oxidation after 1 month in anoxic conditions (Roslev & King, 1996). Thus, detecting methanotrophs when the water column is stratified and the epilimnion is anaerobic or anoxic at the water–sediment interface is consistent with their ecological tolerance toward O₂ limitation. However, detecting methanotrophs in the deeper sediment layers (9–10 and 19–20 cm), where anoxic conditions are permanent, seems surprising. Further work is needed to assess methanotrophic viability using RNA-based approaches (FISH or mRNA work). If they are not viable, it is possible that the detected DNA was a lacustrine record of past methanotroph communities, as previously demonstrated for Cyanobacteria in Lake Bourget, France (Domaizon et al., 2013; Savichtcheva et al., 2014), and methanogens in Lake Narlay (France, Belle et al., 2014). A general paradigm for methanogens is that they require anoxia, despite recent evidence that methanogenesis occurs in well-oxygenated lake water (Grossart et al., 2011; Tang et al., 2014). Two hypotheses can explain the detection of methanogens in the first cm of the Lake Bourget sediment column: (i) the sampling interval (1 cm) exceeded the oxygen diffusion depth (generally <5 mm, Viollier et al., pers. comm.), allowing for the presence of a methanogen community in anoxia, or (ii) the occurrence of methanogens, such as *Methanosarcina* or *Methanocella* allowed for the transcription of catalase genes to detoxify reactive oxygen species and produce methane, as previously demonstrated in soils (Angel et al. 2011).

Our sampling strategy was designed to ensure maximal reproducibility at the site scale (i.e., using a multicorer instead of carrying out three successive corings), whereas the three sampling sites were chosen due to their contrasting environmental characteristics. Site 1 is located within the plume of the main tributary of Lake Bourget. With a depth of 65 m, the deeper part of the water column is not subjected to seasonal hypoxia. Within this area, the sediment was gas-rich (Chapron et al., 2005), as determined using a seismic

reflection survey, suggesting the possible presence of dissolved methane in the interstitial water. Site 3 is located in the deepest part of the lake (depth of 147 m), and the deeper layers of the water column frequently undergo hypoxia (Jenny et al., 2013; INRA database Observatory on lakes—SOERE OLA <http://www6.inra.fr/soere-ola>). On the sampling date, the water–sediment interface of site 3 was located within the hypolimnion and was anoxic for almost 4 months (Jacquet et al. 2012). Located between sites 1 and 3, site 2 represents intermediate environmental conditions, as it is outside of the river plume and is characterized by intermediate depth. Despite these contrasting conditions, none of the physical and chemical descriptors, except sediment water content and oxygen concentration at the water–sediment interface, could be differentiated between the three sites. However, the four community structures patterns assessed in the present work differed significantly between sites. RDA analysis demonstrated that community structure variations could be explained by the following environmental conditions: median particle sizes for the four studied communities; carbonate and total carbon contents for all communities but archaea; water oxygen saturation for all communities but methanotrophs; total nitrogen and water contents for bacteria only, and organic matter content for methanogens only. Bacteria and methanotrophs community structures exhibited stronger site discrimination than archaea and methanogens, which is consistent with previous reports suggesting that archaeal and bacterial microorganisms respond differently to environmental conditions (Liu et al., 2009; Ye et al., 2009). In lake sediment, archaeal communities are frequently dominated by methanogens, as demonstrated on Lake Soyang (Korea, Go et al., 2000), on Lake Kinneret (Israel, Schwarz et al., 2007) or on Lake Pavin (France, Borrel et al., 2012). Other uncultured *Euryarchaeota* are also present in freshwater sediment such as Marine Benthic Group-D (MBG-D), Rice Cluster V (RC V) or the Lake Dagow Sediments (LDS) (Chan et al., 2005; Conrad et al., 2007; Ye et al., 2009; Conrad et al., 2010; Bhattarai et al., 2012; Borrel et al., 2012). *Creanarchaeota*/*Thaumarchaeota* lineages are also detected, such as Miscellaneous Crenarchaeotal Group (MCG), MBG-B (Conrad et al., 2010; Schubert et al., 2011; Borrel et al., 2012) for example. Bacterial community diversity and structure are correlated with pH, sediment organic matter,

carbon and nitrogen contents (Hollister et al., 2010), sediment pore water salinity (Swan et al., 2010), and water quality at the sediment water interface (Liu et al., 2009). Water chemistry (for pore water or at the sediment interface) was not assessed in the present work but it is likely that epi- and hypolimnetic waters were characterized by different concentrations of C and N forms. Both organic matter and carbon quantity and quality were previously related to changes in microbial community structure and function (Docherty et al., 2006). Here, the sampling site location (within/outside the river plume or in the deepest area) is probably responsible for the variability in the organic matter origin (allochthonous or autochthonous), explaining the community structure differences. Interestingly, the water content was significantly different between the three studied sites, and it was previously described as a controlling factor for benthic microbial communities (Wu et al., 2008; Röske et al., 2012). In sediment, the water content is correlated to porosity (Avnimelech et al., 2001) and it was suggested that its relationship with microbial community structure was a function of its influence on sediment oxygen concentrations, via diffusion mechanisms (Hollister et al. 2010), this would only be relevant for the few top millimeters of the sediment when the water column is oxygenated in this study.

Conclusion

The present work demonstrates that total and functional microbial community structures can be differentiated according to local environmental conditions (i.e., redox conditions), global environmental conditions (i.e., Lake Bourget stratification at sampling time), and geographical position within the lake relatively to major tributaries. Micro-scale heterogeneity did not affect the community structure within the same core, and it moderately affected heterogeneity between cores collected within a same sampling site. Pooling DNA extracts ahead of genotyping decreased the observed OTU number, suggesting that the independent characterization of 2–3 replicates would provide better insights into microbial communities. Total (bacteria and archaea) and functional (methanogens and methanotrophs) communities were controlled by environmental parameters, and bacteria seemed to be more prone to exhibit different

community structures in relation to depth within the sediment. In view of our results, analysing only one core per site seems sufficient to horizontally characterize microbial benthic community structures, but the vertical (depth-related) structure of functional communities requires detailed investigations within each core. The assessment of functional community structure and diversity in lakes should integrate all of these spatial scales and lake temporal dynamics to gain a better understanding of the microbial contribution to biogeochemical cycles.

Acknowledgments Elodie Billard was supported by a Ph.D. fellowship from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. We thank Emmanuel Mallet and Jean-Philippe Jenny for field assistance, as well as Annie Millery and Cécile Pignol for sediment characterization analyses. We utilized the database from the observatory on peri alpine lakes (SOERE OLA: <http://www6.inra.fr/soere-ola>) as the source of complementary data on Lake Bourget. We thank the two anonymous reviewers whose comments improved the manuscript.

References

- Angel, R., D. Matthies & R. Conrad, 2011. Activation of methanogenesis in arid biological soil crusts despite the presence of oxygen. *Plos One* 6: e20453.
- Auman, A. J., S. Stolyar, A. M. Costello & M. E. Lidstrom, 2000. Molecular characterization of methanotrophic isolates from freshwater lake sediment. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 5259–5266.
- Avnimelech, Y., G. Ritvo, L. E. Meijer & M. Kochba, 2001. Water content, organic carbon, and dry bulk density in flooded sediments. *Aquacultural Engineering* 25: 25–33.
- Barbier, B. A., I. Dziduch, S. Liebner, L. Ganzert, H. Lantuit, W. Pollard & D. Wagner, 2012. Methane-cycling communities in a permafrost-affected soil on Herschel Island, Western Canadian Arctic: active layer profiling of *mcrA* and *pmoA* genes. *FEMS Microbiology Ecology* 82: 287–302.
- Bhattarai, S., K. A. Ross, M. Schmid, F. S. Anselmetti & H. Bürgmann, 2012. Local conditions structure unique Archaeal communities in the anoxic sediments of meromictic Lake Kivu. *Microbiology Ecology* 64: 291–310.
- Belle, S., C. Parent, V. Frossard, V. Verneaux, L. Millet, P.-M. Chronopoulou, P. Sabatier & M. Magny, 2014. Temporal changes in the contribution of methane-oxidizing bacteria to the biomass of chironomid larvae determined using stable carbon isotopes and ancient DNA. *Journal of Paleolimnology* 52: 215–228.
- Bertics, V. J. & W. Ziebis, 2009. Biodiversity of benthic microbial communities in bioturbated coastal sediments is controlled by geochemical microniches. *The ISME Journal* 3: 1269–1285. doi:10.1038/ismej.2009.62.
- Bidre-Petit, C., D. Jézéquel, E. Dugat-Bony, F. Lopes, J. Kuever, G. Borrel, E. Viollier, G. Fonty & P. Peyret, 2011.

- Identification of microbial communities involved in the methane cycle of a freshwater meromictic lake. *FEMS Microbiology Ecology* 77: 533–545.
- Bienhold, C., A. Boetius & A. Ramette, 2012. The energy-diversity relationship of complex bacterial communities in Arctic deep-sea sediments. *The ISME Journal* 6: 724–732.
- Borrel, G., D. Jézéquel, C. Biderre-Petit, N. Morel-Desrosiers, J.-P. Morel, P. Peyret, G. Fonty & A.-C. Lehours, 2011. Production and consumption of methane in freshwater lake ecosystems. *Research in Microbiology* 162: 832–847.
- Borrel, G., A.-C. Lehours, O. Crouzet, D. Jézéquel, K. Rockne, A. Kulczak, E. Duffaud, K. Joblin & G. Fonty, 2012. Stratification of Archaea in the deep sediments of a freshwater meromictic lake: vertical shift from methanogenic to uncultured Archaeal lineages. *PLOS One* 7: e43346.
- Boume, D. G., I. R. McDonald & J. C. Murrell, 2001. Comparison of *pmoA* PCR primer sets as tools for investigating methanotroph diversity in three danish soils. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 3802–3809.
- Bowen, J. L., H. G. Morrison, J. E. Hobbie & M. L. Sogin, 2012. Salt marsh sediment diversity: a test of the variability of the rare biosphere among environmental replicates. *The ISME Journal* 6: 2014–2023.
- Brandl, H., K. W. Hanselmann, R. Bachoffen & J. Picard, 1993. Small-scale patchiness in the chemistry and microbiology of sediments in Lake Geneva, Switzerland. *Journal of General Microbiology* 139: 2271–2275.
- Canning-Clode, J., N. Valdivia, M. Molis, J. C. Thomason & M. Wahl, 2008. Estimation of regional richness in marine benthic communities: quantifying the error. *Limnology and Oceanography* 6: 580–590.
- Chan, O. C., P. Claus, P. Casper, A. Ulrich, T. Lueders & R. Conrad, 2005. Vertical distribution of structure and function of the methanogenic archaeal community in Lake Dagow sediment. *Environmental Microbiology* 7: 1139–1149.
- Chapron, E., F. Arnaud, H. Noël, M. Revel, M. Desmet & L. Perdureau, 2005. Rhone River flood deposits in Lake Le Bourget: a proxy for Holocene environmental changes in the NW Alps, France. *Boreas* 34: 404–416.
- Chaudhary, P. P., L. Brablcova, I. Buriankova & M. Rulik, 2013. Molecular diversity and tools for deciphering the methanogen community structure and diversity in freshwater sediments. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97: 7553–7562.
- Clarke, K. R. & R. M. Warwick, 2001. Change in Marine Communities: An Approach to Statistical Analysis and Interpretation, 2nd ed. PRIMER-E, Plymouth.
- Conrad, R., 1996. Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO). *Microbiology Reviews* 60: 609–640.
- Conrad, R., O. C. Chan, P. Claus & P. Casper, 2007. Characterization of methanogenic Archaea and stable isotope fractionation during methane production in the profundal sediment of an oligotrophic lake (Lake Stechlin, Germany). *Limnology and Oceanography* 52: 1393–1406.
- Conrad, R., 2009. The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved. *Environmental Microbiology Reports* 1: 285–292.
- Conrad, R., P. Claus & P. Casper, 2010. Stable isotope fractionation during the methanogenic degradation of organic matter in the sediment of an acidic bog lake, Lake Grosse Fuchskuhle. *Limnology and Oceanography* 55: 1932–1942.
- Costello, A. M. & M. E. Lidstrom, 1999. Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 5066–5074.
- Crowe, S. A., S. Katsev, K. Leslie, A. Sturm, C. Magen, S. Nomosatryo, M. A. Pack, J. D. Kessler, W. S. Reeburgh, J. A. Roberts, L. Gonzalez, G. Douglas Haffner, A. Mucci, B. Sundby & D. A. Fowle, 2011. The methane cycle in ferruginous Lake Matano. *Geobiology* 9: 61–78.
- Deutzmann, J. S., S. Wörmers & B. Schink, 2011. Activity and diversity of methanotrophic Bacteria at methane seeps in Eastern Lake Constance sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 2573–2581.
- Docherty, K. M., K. C. Young, P. A. Maurice & S. D. Bridgman, 2006. Dissolved organic matter concentration and quality influences upon structure and function of freshwater microbial communities. *Microbial Ecology* 52: 378–388.
- Domaizon, I., O. Savichtcheva, D. Debroas, F. Amaud, C. Villar, C. Pignol, B. Alric & M. E. Perga, 2013. DNA from lake sediments reveals the long-term dynamics and diversity of *Synechococcus* assemblages. *Biogeosciences* 10: 3817–3838.
- Dray, S. & A. B. Dufour, 2007. The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software* 22: 1–20.
- Edlund, A., F. Hårdeman, J. K. Jansson & S. Sjöling, 2008. Active bacterial community structure along vertical redox gradients in Baltic Sea sediment. *Environmental Microbiology* 10: 2051–2063.
- Fenchel, T. & B. J. Finlay, 1995. Ecology and Evolution in Anoxic Worlds. Oxford University Press, Oxford.
- Fenchel, T., G. M. King & T. H. Blackburn, 1998. Bacterial Biochemistry: The Ecophysiology of Mineral Cycling, 2nd ed. Academic Press, San Diego.
- Gantner, S. A., A. F. Andersson, L. Alonso-Sáez & S. Bertilsson, 2011. Novel primers for 16S rRNA-based archaeal community analyses in environmental samples. *Journal of Microbiological Methods* 84: 12–18.
- Garrity, G. M. & J. G. Holt, 2001. Phylum AII. Euryarchaeota. In Boone, D. R., R. W. Castenholz & G. M. Garrity (eds), *Bergey's Manual*, 2nd ed. Springer, New York, NY: 211–355.
- Gilbert, J. A., D. Field, P. Swift, L. Newbold, A. Oliver, T. Smyth, P. J. Somerfield, S. Huse & I. Joint, 2009. The seasonal structure of microbial communities in the Western English Channel. *Environmental Microbiology* 11: 3132–3139.
- Go, Y. S., S. K. Han, I. G. Lee & T. I. Ahn, 2000. Diversity of the domain Archaea as determined by 16S rRNA gene analysis in the sediments of Lake Soyang. *Archiv Fur Hydrobiologie* 149: 459–466.
- Gobet, A., A. Boetius & A. Ramette, 2014. Ecological coherence of diversity patterns derived from classical fingerprinting and next generation sequencing techniques. *Environmental Microbiology* 16: 2672–2681.
- Grossart, H.-P., K. Frindte, C. Dzallas, W. Eckert & K. W. Tang, 2011. Microbial methane production in oxygenated water column of an oligotrophic lake. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 19657–19661.

- Hales, B. A., C. Edwards, D. A. Ritchie, G. Hall, R. W. Pickup & J. R. Saunders, 1996. Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 668–675.
- Heino, J., P. Louhi & T. Muotka, 2004. Identifying the scales of variability in stream macroinvertebrate abundance, functional composition and assemblage structure. *Freshwater Biology* 49: 1230–1239.
- Heiri, O., A. F. Lotter & G. Lemcke, 2001. Loss on ignition as a method for estimating organic and carbonate content in sediments: reproducibility and comparability of results. *Journal of Paleolimnology* 25: 101–110.
- Hewson, I., M. E. Jacobson Meyers & J. A. Fuhrman, 2007. Diversity and biogeography of bacterial assemblages in surface sediments across the San Pedro Basin, Southern California Borderlands. *Environmental Microbiology* 9: 923–933.
- Hollister, E. B., A. S. Engledow, A. J. M. Hammett, T. L. Provin, H. H. Wilkinson & T. J. Gentry, 2010. Shifts in microbial community structure along an ecological gradient of hypersaline soils and sediments. *The ISME Journal* 4: 829–838.
- IPCC, 2007. Contribution of working group I to the Fourth Assessment Report of the IPCC. In Marquis, M., K. B. Averyt, M. Tignor & H. L. Miller (eds), *Climate Change 2007: The Physical Science Basis*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Jackson, C. R. & A. Q. Weeks, 2008. Influence of particle size on bacterial community structure in aquatic sediments as revealed by 16S rRNA gene sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 5237–5240.
- Jackson, D. & H. Harvey, 1993. Fish and benthic invertebrates: community concordance and community–environment relationships. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50: 2641–2651.
- Jackson, D. A., 1995. PROTEST: a Procrustean randomization test of community environment. *Ecoscience* 2: 297–303.
- Jacob, M., T. Soltwedel, A. Boetius & A. Ramette, 2013. Biogeography of deep-sea benthic bacteria at regional scale (LTER HAUSGARTEN, Fram Strait, Arctic). *PLOS One* 8: e72779.
- Jacquet, S., D. Barbet, S. Cachera, A. Caudron, M. Colon, C. Girel, J. Guillard, A. Hébert, F. Kerrien, L. Laine, J. Lazzarotto, J.-P. Moille, G. Paolini, M. E. Perga, P. Pemey & F. Rimet, 2012. Suivi environnemental des eaux du lac du Bourget pour l'année 2011. *Rapport INRA-CISALB-CALB*: 220 pp.
- Jenny, J. P., F. Amaud, J. M. Dorioz, C. Giguët-Covex, V. Frossard, P. Sabatier, L. Millet, J. L. Reyss, K. Tachikawa, E. Bard, C. Pignol, F. Soufi & M. E. Perga, 2013. A spatiotemporal investigation of varved sediments highlights the dynamics of hypolimnetic hypoxia in a large hard-water lake over the last 150 years. *Limnology and Oceanography* 58: 1395–1408.
- Junier, P., T. Junier & K.-P. Witzel, 2008. TRIFLe, a program for in silico terminal restriction fragment length polymorphism analysis with user-defined sequences sets. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 6452–6456.
- Knittel, K. & A. Boetius, 2009. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process. *Annual Reviews of Microbiology* 63: 311–334.
- Krause, S., C. Lüke & P. Frenzel, 2010. Succession of methanotrophs in oxygen–methane counter-gradients of flooded rice paddies. *The ISME Journal* 4: 1603–1607.
- Leuko, S., F. Goh, M. A. Allen, B. P. Burns, M. R. Walter & B. A. Neilan, 2007. Analysis of intergenic spacer region length polymorphisms to investigate the halophilic archaeal diversity of stromatolites and microbial mats. *Extremophiles* 11: 203–210.
- Liu, F. H., G. H. Lin, G. Gao, B. Q. Qin, J. S. Zhang, G. P. Zhao, Z. H. Zhou & J. H. Shen, 2009. Bacterial and archaeal assemblages in sediments of a large shallow freshwater lake, Lake Taihu, as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Applied Microbiology* 106: 1022–1032.
- Lueders, T. & M. W. Friedrich, 2003. Evaluation of PCR amplification bias by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of small-subunit rRNA and *mcrA* genes by using defined template mixtures of methanogenic pure cultures and soil DNA extracts. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 320–326.
- Lyautey, E., A. Cournet, S. Morin, S. Bouléreau, L. Etcheverry, J. Y. Charcosset, F. Delmas, A. Bergel & F. Garabetian, 2011. Electroactivity of phototrophic river biofilms and constitutive cultivable Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 5394–5401.
- Ma, K., R. Conrad & Y. Lu, 2013. Dry/wet cycles change the activity and population dynamics of methanotrophs in rice field soil. *Applied and Environmental Microbiology* 79: 4932–4939.
- Madsen, E. L., 2011. Microorganisms and their roles in fundamental biogeochemical cycles. *Current Opinion in Biotechnology* 22: 456–464.
- Murase, J. & P. Frenzel, 2007. A methane-driven microbial food web in a wetland rice soil. *Environmental Microbiology* 9: 3025–3034.
- Nam, Y. D., Y. Sung, H. W. Chang, S. W. Roh, K. H. Kim, S. K. Rhee, J. C. Kim, J. Y. Kim, J. H. Yoon & J. W. Bae, 2008. Characterization of the depth-related changes in the microbial communities in Lake Hovsgol sediment by 16S rRNA gene-based approaches. *Journal of Microbiology* 46: 125–136.
- Nolla-Ardèvol, V., M. Strous, D. Y. Sorokin, A. Y. Merkel & H. E. Tegetmeyer, 2012. Activity and diversity of haloalkaliphilic methanogens in Central Asian soda lakes. *Journal of Biotechnology* 161: 167–173.
- Normand, P., C. Ponsonnet, X. Nesme, M. Neyra & P. Simonet, 1996. ITS analysis of prokaryotes. In Akkermans, D. L., J. D. van Elsas & F. J. de Bruijn (eds), *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 1–12.
- Oksanen, J., F. G. Blanchet, R. Kindt, P. Legendre, P. R. Minchin, R. B. O'Hara, G. L. Simpson, P. Solymos, M. H. H. Stevens & H. Wagner, 2013. *vegan: Community Ecology Package*. R package Version 2.0-6. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Oliveros, J. C., 2007. Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. <http://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.
- Paavola, R., T. Muotka, R. Virtanen, J. Heino, D. Jackson & A. Maki-Petäys, 2006. Spatial scale affects community concordance among fishes, benthic macroinvertebrates, and

- bryophytes in streams. *Ecological Applications* 16: 368–379.
- Paerl, H. W. & T. F. Steppe, 2003. Scaling up: the next challenge in environmental microbiology. *Environmental Microbiology* 5: 1025–1038.
- Peres-Neto, P. R. & D. A. Jackson, 2001. How well do multivariate data sets match? Evaluating the association of multivariate biological data sets: comparing the robustness of Mantel test and a Procrustean superimposition approach. *Oecologia* 129: 169–178.
- Priscu, J. C., C. H. Fritsen, E. E. Adams, S. J. Giovannoni, H. W. Paerl, C. P. McKay, P. T. Doran, D. A. Gordon, B. D. Lanoil & J. L. Pinckney, 1998. Perennial antarctic lake ice: an oasis for life in a polar desert. *Science* 280: 2095–2098.
- R Development Core Team, 2014. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <http://www.r-project.org/>.
- Rahalkar, M., J. Deutzmann, B. Schink & I. Bussmann, 2009. Abundance and activity of methanotrophic bacteria in littoral and profundal sediments of Lake Constance (Germany). *Applied and Environmental Microbiology* 75: 119–126.
- Ramette, A., 2009. Quantitative community fingerprinting methods for estimating the abundance of operational taxonomic units in natural microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 2495–2505.
- Reeburgh, W. S., 2007. Oceanic methane biogeochemistry. *Chemical Reviews* 107: 486–513.
- Röske, K., R. Sachse, C. Scheerer & I. Röske, 2012. Microbial diversity and composition of the sediment in the drinking water reservoir Saldenbach (Saxonia, Germany). *Systematic and Applied Microbiology* 35: 35–44.
- Roslev, P. & G. M. King, 1996. Regulation of methane oxidation in a freshwater wetland by water table changes and anoxia. *FEMS Microbiology Ecology* 19: 105–115.
- Roussel, E. G., A. L. Sauvadet, J. Allard, C. Chaduteau, P. Richard, M. A. Cambon Bonavita & E. Chaumillon, 2009. Archaeal methane cycling communities associated with gassy subsurface sediments of Marennes-Oléron Bay (France). *Geomicrobiology Journal* 26: 31–43.
- Savichtcheva, O., D. Debroas, M. E. Perga, F. Arnaud, C. Villar, E. Lyautey, A. Kirkham, C. Chardon, B. Alric & I. Domaizon, 2014. Effects of nutrients and warming on *Planktothrix* dynamics and diversity: a paleolimnological view based on sedimentary DNA and RNA. *Freshwater Biology*. doi:10.1111/fwb.12465.
- Schubert, C. J., F. Vazquez, T. Lösekann-Behrens, K. Knittel, M. Tonolla & A. Boetius, 2011. Evidence for anaerobic oxidation of methane in sediments of a freshwater system (Lago di Cadagno). *FEMS Microbiology Ecology* 76: 26–38.
- Schultz, P. & N. R. Urban, 2008. Effects of bacterial dynamics on organic matter decomposition and nutrient release from sediments: a modeling study. *Ecological Modelling* 210: 1–14.
- Schwarz, J. I. K., W. Eckert & R. Conrad, 2007. Community structure of Archaea and Bacteria in a profundal lake sediment Lake Kinneret (Israel). *Systematic and Applied Microbiology* 30: 239–254.
- Semrau, J. D., A. A. DiSpirito & S. Yoon, 2010. Methanotrophs and copper. *FEMS Microbiology Reviews* 34: 496–531.
- Shivaji, S., K. Kumari, K. H. Kishore, P. K. Pindi, P. S. Rao, T. N. R. Srinivas, R. Asthana & R. Ravindra, 2011. Vertical distribution of bacteria in a lake sediment from Antarctica by culture-independent and culture-dependent approaches. *Research in Microbiology* 162: 191–203.
- Swan, B. K., C. J. Ehrhardt, K. M. Reifel, L. I. Moreno & D. L. Valentine, 2010. Archaeal and Bacterial communities respond differently to environmental gradients in anoxic sediments of a California hypersaline lake, the Salton Sea. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 757–768.
- Tang, K. W., D. F. McGinnis, K. Frindte, V. Brüchert & H.-P. Grossart, 2014. Paradox reconsidered: methane oversaturation in well-oxygenated lake waters. *Limnology and Oceanography* 59: 275–284.
- Trolle, D., G. Zhu, H. Hamilton, L. Luo, C. McBride & L. Zhang, 2009. The influence of water quality and sediment geochemistry on the horizontal and vertical distribution of phosphorus and nitrogen in sediments of a large, shallow lake. *Hydrobiologia* 627: 31–44.
- Tšertova, N., A. Kisand, F. Baty & V. Kisand, 2013. Homogeneous microbial diversity in the upper sediment layers of a shallow lake. *Aquatic Microbial Ecology* 70: 77–85.
- Wu, L., L. Kellogg, A. H. Devol, J. M. Tiedje & J. Zhou, 2008. Microarray-based characterization of microbial community functional structure and heterogeneity in marine sediments from the Gulf of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 4516–4529.
- Ye, W., X. Liu, S. Lin, J. Tan, J. Pan, D. Li & H. Yang, 2009. The vertical distribution of bacterial and archaeal communities in the water and sediment of Lake Taihu. *FEMS Microbiology Ecology* 70: 263–276.

Données complémentaires (Supplementary material)

Material and methods: reproducibility tests for genotyping methods (ARISA and T-RFLP)

Reproducibility of the genotyping techniques used has been assessed for our environmental sediment samples on Lake Bourget, France. PCR bias was assessed on sediment samples that were independently amplified 3 times. For methanogens, a variability of 0.77 ± 0.23 OTUs out of 4 OTUs detected on average (CV = 30%) was observed. As for structure, based on Jaccard similarity, a variability of 6.0% (CV) was detected. For methanotrophs, a variability of 0.58 ± 0.15 OTUs out of 6 OTUs detected on average (CV = 26%) was recorded and based on Jaccard similarity, a variability of 5.6% (CV) was detected for structure. For Bacteria, the variability was of 4.6 ± 1.2 OTUs out of 44 OTUs detected on average (CV = 26%) for OTU number and of 1.6% (CV) for structure.

Supplementary Table S1 For bacterial, archaeal, methanotrophs and methanogens community, intra-core and intra-site variability observed for OTU number: minimum and maximum OTU numbers, and calculated average ± SD and CV (%) values. Intra-core analysis is based on 5 replicate samples collected within 1 cm layers (0-1 cm, 9-10 cm or 19-20 cm) of a given core, and intra-site analysis is based on 15 replicate samples collected within 1 cm layers of the 3 cores collected at the same site (5 replicates per layer and per core)

Site	Depth (cm)	Core	Bacteria			Archeae			Methanotrophs						Methanogens											
			Intra-core			Intra-site			Intra-core			Intra-site			Intra-core			Intra-site			Intra-core			Intra-site		
			min - max	average ± SD	CV (%)	min - max	average ± SD	CV (%)	min - max	average ± SD	CV (%)	min - max	average ± SD	CV (%)	min - max	average ± SD	CV (%)	min - max	average ± SD	CV (%)	min - max	average ± SD	CV (%)	min - max	average ± SD	CV (%)
1	0-1	C1	33 - 42	39.0 ± 3.7	15				6 - 7	6.4 ± 0.5	9				5 - 9	6.6 ± 1.8	27				4 - 6	4.6 ± 0.8	19			
		C2	31 - 39	35.2 ± 3.7	13	31 - 48	40.3 ± 5.1	13	6 - 7	6.2 ± 0.4	7	5 - 11	6.6 ± 1.4	21	4 - 10	6.8 ± 2.3	34	4 - 10	5.8 ± 1.7	29	4 - 6	5.0 ± 1.0	20	3 - 6	4.2 ± 0.9	23
		C3	37 - 44	40.4 ± 2.8	11				6 - 8	7.0 ± 0.7	10				4 - 6	5.2 ± 0.8	15				3 - 4	3.6 ± 0.5	14			
	9-10	C1	27 - 32	29.2 ± 2.2	14				2 - 8	5.2 ± 2.2	44				2 - 5	3.8 ± 1.0	26				2 - 5	3.2 ± 1.3	41			
		C2	25 - 34	29.8 ± 3.4	11	25 - 50	37.6 ± 8.2	22	4 - 8	5.2 ± 1.6	32	2 - 10	6.6 ± 2.1	33	2 - 3	2.2 ± 0.5	23	2 - 7	3.8 ± 1.5	39	3 - 5	4.0 ± 1.0	25	2 - 6	3.1 ± 1.2	39
		C3	39 - 47	43.2 ± 2.8	6				7 - 10	8.2 ± 1.3	16				4 - 6	5.0 ± 0.7	14				2 - 3	2.6 ± 0.5	19			
	19-20	C1	29 - 37	32.8 ± 3.5	11				7 - 11	8.8 ± 1.6	19				4 - 8	5.8 ± 1.4	24				3 - 4	3.7 ± 0.5	13			
		C2	34 - 38	36.2 ± 1.7	5	29 - 52	39.8 ± 7.1	18	5 - 8	7.2 ± 1.3	18	5 - 11	8.8 ± 1.6	18	2 - 6	4.6 ± 1.9	41	2 - 8	4.8 ± 1.6	33	3 - 4	3.3 ± 0.5	17	2 - 5	3.2 ± 0.9	30
		C3	43 - 47	45.2 ± 2.0	4				9 - 11	10.2 ± 0.8	8				4 - 6	5.0 ± 0.7	14				2 - 4	2.8 ± 1.0	36			
2	0-1	C1	34 - 43	37.6 ± 4.1	11				6 - 9	7.2 ± 1.3	18				3 - 9	5.2 ± 2.3	44				3 - 4	3.4 ± 0.5	16			
		C2	37 - 46	42.6 ± 3.9	9	34 - 49	41.6 ± 4.2	10	8 - 12	10.8 ± 1.6	15	6 - 13	9.3 ± 2.2	24	4 - 6	4.8 ± 0.8	17	3 - 9	4.7 ± 1.6	34	3 - 5	4.0 ± 0.7	18	2 - 5	3.3 ± 0.7	22
		C3	41 - 49	44.4 ± 3.1	7				9 - 11	10.0 ± 1.0	10				3 - 4	3.4 ± 0.5	15				3 - 4	3.2 ± 0.4	13			
	9-10	C1	47 - 50	48.0 ± 1.4	3				7 - 12	9.8 ± 2.1	22				5 - 6	5.2 ± 0.5	10				2 - 5	3.4 ± 1.5	45			
		C2	30 - 46	38.6 ± 6.0	16	30 - 50	43.5 ± 5.6	13	5 - 9	7.8 ± 1.7	23	5 - 12	8.9 ± 1.8	20	2 - 6	3.7 ± 1.7	46	2 - 8	5.5 ± 1.5	27	3 - 4	3.5 ± 0.5	16	2 - 7	3.8 ± 1.3	34
		C3	40 - 49	44.2 ± 4.0	9				7 - 9	8.2 ± 0.8	10				5 - 7	6.0 ± 0.7	12				3 - 5	3.6 ± 0.8	22			
	19-20	C1	36 - 46	40.6 ± 3.7	9				8 - 12	9.8 ± 1.7	18				2 - 5	3.8 ± 1.3	34				2 - 5	3.6 ± 1.1	32			
		C2	38 - 49	43.6 ± 4.6	11	34 - 49	42.2 ± 4.7	11	4 - 13	8.4 ± 3.7	45	4 - 13	8.4 ± 2.3	28	3 - 3	3.0 ± 0.0	0	2 - 5	3.5 ± 0.9	26	3 - 5	4.0 ± 1.1	29	2 - 5	3.4 ± 1.1	33
		C3	34 - 48	40.6 ± 6.1	15				8 - 10	9.2 ± 0.8	9				3 - 4	3.2 ± 0.4	13				2 - 3	2.6 ± 0.5	19			
3	0-1	C1	39 - 53	47.0 ± 6.1	13				11 - 14	12.6 ± 1.1	9				4 - 6	4.8 ± 0.8	17				4 - 5	4.4 ± 0.5	11			
	9-10	C2	38 - 48	43.4 ± 4.9	11				10 - 12	11.2 ± 1.0	9				4 - 6	5.4 ± 0.8	15				3 - 5	4.2 ± 1.0	24			
	19-20	C3	38 - 53	45.2 ± 6.3	14				5 - 12	10.8 ± 2.1	19				3 - 4	3.4 ± 0.5	15				4 - 5	4.6 ± 0.5	11			

Supplementary Table S2 For bacterial, archaeal, methanotrophs and methanogens community, intra-core and intra-site variability observed for structure: minimum and maximum values of Jaccard similarity, and calculated average ± SD and CV (%) values. Intra-core analysis is based on 5 replicate samples collected within 1 cm layers (0-1 cm, 9-10 cm or 19-20 cm) of a given core, and intra-site analysis is based on 15 replicate samples collected within 1 cm layers of the 3 cores collected at the same site (5 replicates per layer and per core)

Site	Depth (cm)	Core	Bacteria						Archeae						Methanotrophs						Methanogens					
			Intra-core			Intra-site			Intra-core			Intra-site			Intra-core			Intra-site			Intra-core			Intra-site		
			min - max	average ± SD	CV (%)	min - max	average ± SD	CV (%)	min - max	average ± SD	CV (%)	min - max	average ± SD	CV (%)	min - max	average ± SD	CV (%)	min - max	average ± SD	CV (%)	min - max	average ± SD	CV (%)	min - max	average ± SD	CV (%)
1	0-1	C1	0.54 - 0.81	0.65 ± 0.08	12				0.30 - 0.87	0.53 ± 0.24	45				0.50 - 0.87	0.62 ± 0.13	21				0.40 - 0.99	0.71 ± 0.25	35			
		C2	0.62 - 0.85	0.73 ± 0.07	10	0.54 - 0.90	0.76 ± 0.08	11	0.22 - 0.99	0.55 ± 0.24	44	0.16 - 0.99	0.45 ± 0.17	38	0.20 - 0.75	0.48 ± 0.17	35	0.33 - 0.99	0.74 ± 0.17	23	0.40 - 0.99	0.71 ± 0.16	23	0.20 - 0.99	0.64 ± 0.23	36
		C3	0.69 - 0.86	0.78 ± 0.05	6				0.18 - 0.70	0.40 ± 0.16	40				0.60 - 0.99	0.78 ± 0.13	17				0.33 - 0.99	0.61 ± 0.18	30			
	9-10	C1	0.51 - 0.63	0.56 ± 0.04	7				0.25 - 0.75	0.50 ± 0.20	40				0.33 - 0.77	0.57 ± 0.14	25				0.25 - 0.99	0.46 ± 0.24	52			
		C2	0.35 - 0.63	0.46 ± 0.08	17	0.35 - 0.92	0.72 ± 0.14	19	0.28 - 0.60	0.41 ± 0.13	32	0.18 - 0.88	0.46 ± 0.18	39	0.25 - 0.99	0.62 ± 0.41	66	0.20 - 0.99	0.62 ± 0.19	31	0.50 - 0.75	0.63 ± 0.12	19	0.25 - 0.99	0.55 ± 0.26	47
		C3	0.67 - 0.85	0.74 ± 0.05	7				0.25 - 0.88	0.45 ± 0.19	42				0.60 - 0.99	0.74 ± 0.12	16				0.33 - 0.99	0.64 ± 0.33	52			
	19-20	C1	0.66 - 0.87	0.71 ± 0.06	8				0.45 - 0.90	0.65 ± 0.13	20				0.60 - 0.99	0.83 ± 0.12	14				0.50 - 0.99	0.66 ± 0.18	27			
		C2	0.51 - 0.74	0.63 ± 0.08	13	0.51 - 0.87	0.75 ± 0.08	11	0.40 - 0.77	0.56 ± 0.14	25	0.21 - 0.90	0.53 ± 0.15	28	0.33 - 0.99	0.65 ± 0.14	22	0.16 - 0.99	0.55 ± 0.19	35	0.33 - 0.66	0.55 ± 0.19	35	0.25 - 0.99	0.53 ± 0.24	45
		C3	0.75 - 0.85	0.80 ± 0.03	4				0.33 - 0.73	0.49 ± 0.16	33				0.50 - 0.99	0.70 ± 0.14	20				0.25 - 0.99	0.48 ± 0.2	42			
2	0-1	C1	0.62 - 0.86	0.71 ± 0.06	8				0.45 - 0.85	0.61 ± 0.12	20				0.20 - 0.66	0.04 ± 0.16	40				0.66 - 0.99	0.79 ± 0.17	22			
		C2	0.63 - 0.81	0.73 ± 0.05	7	0.52 - 0.86	0.72 ± 0.07	10	0.46 - 0.91	0.63 ± 0.15	24	0.21 - 0.91	0.50 ± 0.15	30	0.60 - 0.99	0.76 ± 0.15	20	0.20 - 0.99	0.61 ± 0.23	38	0.25 - 0.75	0.54 ± 0.18	33	0.25 - 0.99	0.76 ± 0.19	25
		C3	0.61 - 0.79	0.70 ± 0.07	10				0.23 - 0.72	0.44 ± 0.16	36				0.40 - 0.99	0.71 ± 0.20	28				0.50 - 0.99	0.77 ± 0.17	22			
	9-10	C1	0.64 - 0.81	0.74 ± 0.06	8				0.46 - 0.99	0.63 ± 0.16	25				0.60 – 1.00	0.74 ± 0.16	22				0.20 - 0.99	0.44 ± 0.3	68			
		C2	0.63 - 0.78	0.74 ± 0.04	5	0.35 - 0.81	0.66 ± 0.10	15	0.62 - 0.99	0.78 ± 0.12	15	0.30 - 0.99	0.58 ± 0.16	28	0.20 - 0.80	0.51 ± 0.21	41	0.20 - 0.99	0.65 ± 0.15	23	0.66 - 0.99	0.77 ± 0.17	22	0.20 - 0.99	0.53 ± 0.23	43
		C3	0.62 - 0.71	0.66 ± 0.03	5				0.33 - 0.90	0.60 ± 0.20	33				0.42 - 0.99	0.64 ± 0.18	28				0.33 - 0.83	0.56 ± 0.14	25			
	19-20	C1	0.51 - 0.74	0.62 ± 0.06	10				0.53 - 0.80	0.67 ± 0.09	13				0.28 - 0.99	0.63 ± 0.23	37				0.25 - 0.99	0.58 ± 0.24	41			
		C2	0.46 - 0.75	0.61 ± 0.09	15	0.46 - 0.83	0.64 ± 0.08	13	0.33 - 0.78	0.44 ± 0.16	36	0.14 - 0.81	0.49 ± 0.18	37	0.42 - 1.00	0.65 ± 0.17	26	0.40 - 1.00	0.69 ± 0.20	29	0.50 - 0.99	0.66 ± 0.25	38	0.25 - 0.99	0.57 ± 0.23	40
		C3	0.50 - 0.67	0.60 ± 0.06	10				0.23 - 0.70	0.46 ± 0.17	37				0.50 - 0.99	0.74 ± 0.18	24				0.33 - 0.99	0.55 ± 0.2	36			
3	0-1	C1	0.64 - 0.89	0.74 ± 0.06	8				0.40 - 0.85	0.57 ± 0.13	23				0.33 - 0.75	0.55 ± 0.14	25				0.33 - 0.8	0.61 ± 0.15	25			
	9-10	C2	0.57 - 0.84	0.70 ± 0.10	14				0.46 - 0.85	0.65 ± 0.10	15				0.33 - 0.80	0.54 ± 0.14	26				0.40 - 0.99	0.67 ± 0.21	31			
	19-20	C3	0.66 - 0.90	0.74 ± 0.06	8				0.23 - 0.85	0.47 ± 0.22	47				0.20 - 0.66	0.32 ± 0.13	41				0.50 - 0.75	0.62 ± 0.1	16			

Supplementary Table S3 Distribution of bacterial OTUs, assessed using ARISA, at the three studied sites for each sediment layer. Each OTU corresponds to the size of the peak detected on ARISA electropherogram. A given OTU was considered present (black) when detected in at least one of the replicate sample analyzed for each site and each depth, and absent (white) when undetected in every replicate sample.

OTU	Site 1			Site 2			Site 3		
	0-1 cm	9-10 cm	19-20 cm	0-1 cm	9-10 cm	19-20 cm	0-1 cm	9-10 cm	19-20 cm
161									
169									
172									
173									
174									
175									
177									
180									
181									
182									
183									
184									
185									
186									
191									
192									
195									
196									
200									
207									
210									
214									
215									
220									
221									
222									
227									
228									
232									
233									
236									
238									
239									
240									
241									
242									
245									
246									
247									
248									
249									
250									
251									
253									
255									
257									
258									
259									
260									
262									
263									
264									
265									
266									
269									
274									
275									
276									

278 [REDACTED]
281 [REDACTED]
282 [REDACTED]
283 [REDACTED]
288 [REDACTED]
289 [REDACTED]
290 [REDACTED]
297 [REDACTED]
298 [REDACTED]
299 [REDACTED]
309 [REDACTED]
310 [REDACTED]
311 [REDACTED]
312 [REDACTED]
313 [REDACTED]
314 [REDACTED]
317 [REDACTED]
318 [REDACTED]
319 [REDACTED]
320 [REDACTED]
323 [REDACTED]
325 [REDACTED]
326 [REDACTED]
327 [REDACTED]
328 [REDACTED]
329 [REDACTED]
330 [REDACTED]
333 [REDACTED]
334 [REDACTED]
335 [REDACTED]
337 [REDACTED]
338 [REDACTED]
339 [REDACTED]
341 [REDACTED]
342 [REDACTED]
343 [REDACTED]
344 [REDACTED]
348 [REDACTED]
349 [REDACTED]
352 [REDACTED]
355 [REDACTED]
356 [REDACTED]
357 [REDACTED]
358 [REDACTED]
359 [REDACTED]
362 [REDACTED]
364 [REDACTED]
365 [REDACTED]
366 [REDACTED]
367 [REDACTED]
368 [REDACTED]
373 [REDACTED]
374 [REDACTED]
377 [REDACTED]
378 [REDACTED]
380 [REDACTED]
381 [REDACTED]
382 [REDACTED]
384 [REDACTED]
385 [REDACTED]
386 [REDACTED]
388 [REDACTED]
389 [REDACTED]
390 [REDACTED]
398 [REDACTED]

[illegible]

Supplementary Table S4 Distribution of archaeal T-RFs, assessed using 16S rRNA gene T-RFLP, at the three studied sites for each sediment layer. Each T-RF corresponds to the size of the peak detected on T-RFLP electropherogram. A given T-RF was considered present (black) when detected in at least one of the replicate sample analyzed for each site and each depth, and absent (white) when undetected in every replicate sample.

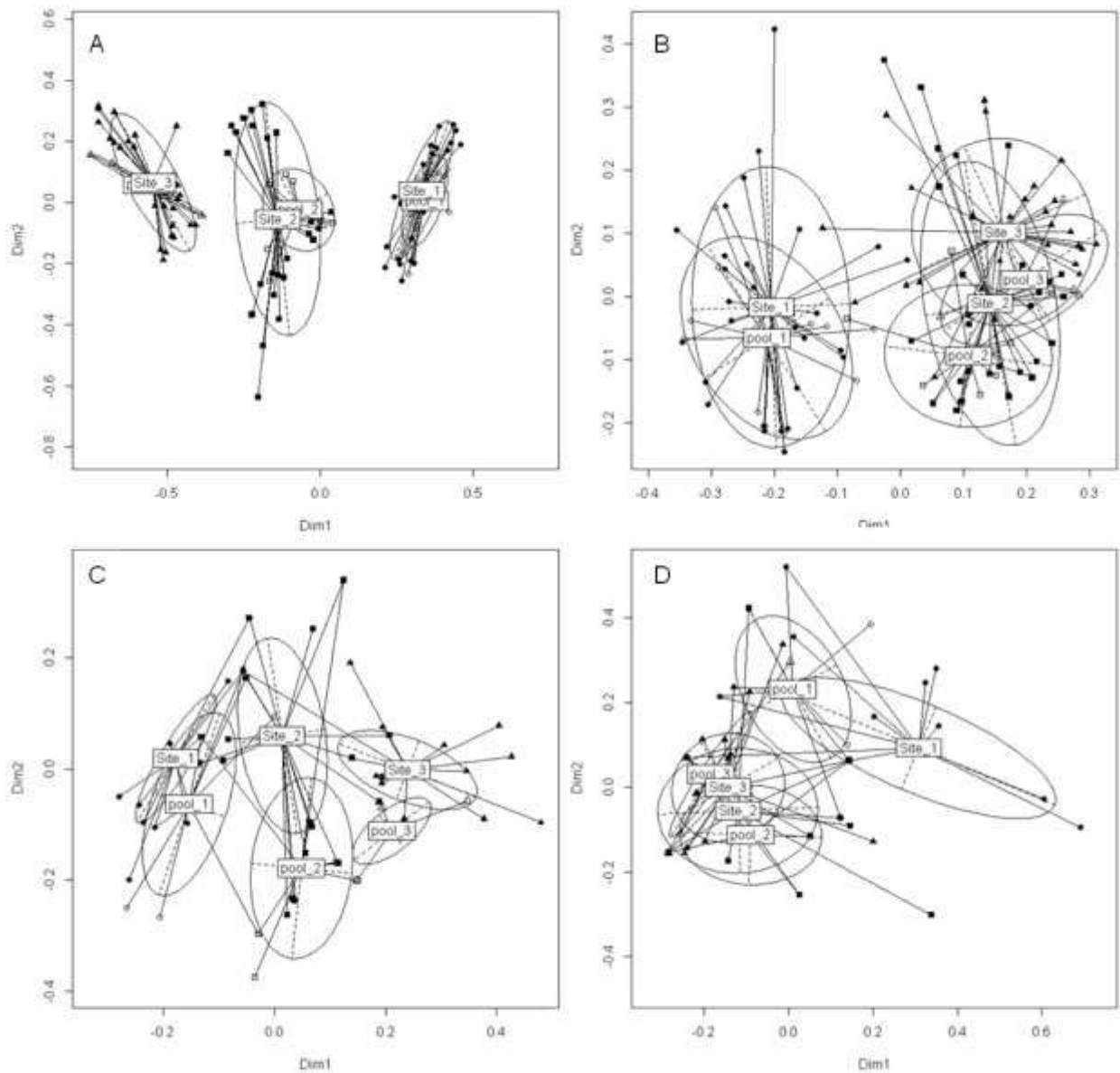
T-RFs	Site 1			Site 2			Site 3		
	0-1 cm	9-10 cm	19-20 cm	0-1 cm	9-10 cm	19-20 cm	0-1 cm	9-10 cm	19-20 cm
65									
79									
87									
101									
115									
125									
129									
131									
145									
155									
163									
179									
183									
191									
193									
197									
199									
201									
203									
217									
223									
231									
233									
235									
245									
247									
255									
261									
267									
269									
285									
317									
327									
333									
339									
347									
381									
383									
385									
387									
419									
437									
443									
457									
459									
463									
467									
473									
483									
497									
501									
517									
523									
527									
535									
543									
551									
573									
575									
589									
595									
597									
655									

Supplementary Table S5 Distribution of methanotrophs T-RFs, assessed using *pmoA* gene T-RFLP, at the three studied sites for each sediment layer. Each T-RF corresponds to the size of the peak detected on T-RFLP electropherogram. A given T-RF was considered present (black) when detected in at least one of the replicate sample analyzed for each site and each depth, and absent (white) when undetected in every replicate sample.

<i>pmoA</i>	Site 1			Site 2			Site 3		
T-RFs	0-1 cm	9-10 cm	19-20 cm	0-1 cm	9-10 cm	19-20 cm	0-1 cm	9-10 cm	19-20 cm
80									
84									
128									
162									
212									
228									
236									
242									
244									
246									
280									
336									
354									
442									
514									

Supplementary Table S6 Distribution of methanogens T-RFs, assessed using *mcrA* gene T-RFLP, at the three studied sites for each sediment layer. Each T-RF corresponds to the size of the peak detected on T-RFLP electropherogram. A given T-RF was considered present (black) when detected in at least one of the replicate sample analyzed for each site and each depth, and absent (white) when undetected in every replicate sample.

<i>mcrA</i>	Site 1			Site 2			Site 3		
T-RFs	0-1 cm	9-10 cm	19-20 cm	0-1 cm	9-10 cm	19-20 cm	0-1 cm	9-10 cm	19-20 cm
40									
88									
148									
212									
214									
288									
290									
348									
566									
578									
752									



Supplementary Fig. S1 nMDS representation of distances between pooled and single (A) bacterial (stress = 0.15), (B) archaeal (stress = 0.36), (C) methanotroph (stress = 0.27) and (D) methanogen (stress = 0.34) community structures based on Jaccard similarity analysis. (Site 1: black circle for single and white circle for pools, Site 2: black square for single and white square for pools, Site 3: black triangle for single and white triangle for pools)

V. Analyse complémentaire

Etude de la variabilité spatiale de la composition des communautés méthanotrophes dans les sédiments du Lac du Bourget

La diversité des méthanotrophes dans les sédiments a été analysée par clonage – séquençage au sein de chaque station (1 banque de clone / station, dates et strates confondues). La diversité des méthanotrophes dans les sédiments du Lac du Bourget sera développée plus en détails dans le chapitre suivant. Cette étude complémentaire traite uniquement des variations spatiales de la diversité observées entre les 3 stations étudiées, pour cela 233 clones ont été analysés, regroupés en 57 OTU à un seuil de 93% (Degelman *et al.*, 2010). La distribution spatiale des OTU est détaillée dans la [Figure 26](#). Celle-ci montre qu'une part importante des OTU est spécifique aux stations 1 et 3. En effet, 41% des OTU identifiées sur la station 1 lui sont spécifiques, tandis que 32% des OTU détectées sont spécifiques sur la station 3. A l'inverse, seulement 15% des OTU détectées pour les échantillons de la station 2 sont spécifiques à cette station car la plus grande partie des OTU sont communes aux autres stations (63%).

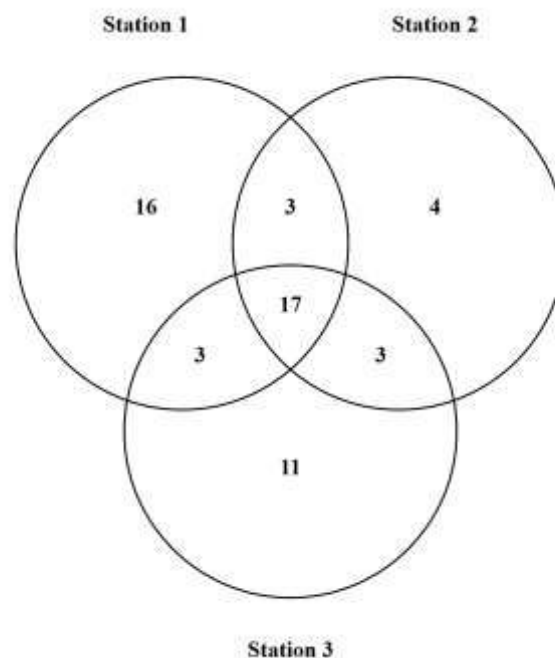


Figure 26 : Diagramme de Venn (Oliveros, 2007) représentation la répartition des OTU méthanotrophes entre les 3 stations étudiées

Les OTU spécifiques à chacune des 3 stations étudiées représentent 54% des OTU observées dans nos échantillons. Ceci représente une part importante, laissant penser que la composition de la diversité des méthanotrophes peut être spatialement différente. Pour tester cette hypothèse, une analyse UniFrac (Lozupone & Knight, 2005) a été réalisée à partir des séquences représentatives de chaque OTU (soit 57 séquences) et entre les 3 stations étudiées. Cette analyse compare, sur la base d'un arbre phylogénétique regroupant tous les OTU, les compositions phylogénétiques (ici méthanotrophes) entre les différentes stations. Ainsi, dans les sédiments du Lac du Bourget, la composition phylogénétique des méthanotrophes n'est pas significativement différente entre les 3 stations étudiées ($p = 0,09$, après correction de Bonferroni). L'absence de différences suggère qu'il n'y a pas d'adaptation locale de cette communauté en lien avec les paramètres environnementaux de chacune des stations.

Au sein de la station 1, parmi les 16 OTU spécifiques (Figure 26), 38% sont affiliées aux méthanotrophes de Type Ia (*Methylococcus* / *Methylocaldum*), 31% aux méthanotrophes de Type Ib (*Methylobacter* / *Methylomonas*), 25% ont été affiliées aux *Methylococcaceae* et 6% aux méthanotrophes de Type II. Pour la station 2, 4 OTU sont spécifiques de cette station dont 3 sont affiliées aux méthanotrophes de Type Ib (2 OTU à *Methylobacter* et 1 OTU à *Methylovulum*) et 1 OTU est affiliée aux méthanotrophes de Type Ia et plus spécifiquement à *Methylococcus*. Pour la station 3, parmi les 11 OTU spécifiques (Figure 26), 5 OTU sont affiliées aux méthanotrophes de Type Ia (dont 4 à *Methylococcus*), 4 OTU aux méthanotrophes de Type Ib (dont 2 à *Methylobacter*) et les 2 autres OTU ont été affiliées aux *Methylococcaceae*. L'absence de différence significative dans la composition phylogénétique des méthanotrophes dans les sédiments du Lac du Bourget peut donc être expliquée par l'absence de taxa spécifiques au sein des stations échantillonnées.

Chapitre IV

—

Etude de la variabilité temporelle des communautés méthanogènes et méthanotrophes benthiques

I. Introduction

Plusieurs études récentes ont souligné la part non négligeable prise par les écosystèmes lacustres dans les émissions de méthane atmosphérique (Bastviken *et al.*, 2011 ; Bussmann *et al.*, 2013 ; Schmid *et al.*, 2013), avec l'observation de pics saisonniers de libération de méthane en lien avec la dynamique saisonnière lacustre (Karlson *et al.*, 2013 ; Fernandez *et al.*, 2014). Il est probable que les communautés microbiennes benthiques impliquées dans le cycle du méthane présentent des modifications de composition, structure et d'abondance reflétant ces variations temporelles. Les études sur les communautés méthanogènes et méthanotrophes se sont le plus souvent focalisées sur l'inventaire de la diversité dans les écosystèmes lacustres, mais peu d'études se sont intéressées aux variations saisonnières auxquelles sont soumises ces communautés dans la zone benthique (Pester *et al.*, 2004 ; Earl *et al.*, 2005 ; Schwarz *et al.*, 2008). S'il a été démontré que les variations de température marquées, notamment dans les rizières et les zones humides, sont un facteur structurant pour ces communautés microbiennes (Conrad *et al.*, 2009 ; Siljanen *et al.*, 2012), il semble que dans les lacs (en particulier les lacs profonds) cet effet soit moindre compte tenu des amplitudes de variations de température très modérées en zones benthiques. Les sédiments lacustres peuvent toutefois, en fonction de leur localisation, être soumis à d'importantes variations saisonnières des conditions physico-chimiques, notamment en termes d'oxygénation au niveau de l'interface eau-sédiment. En effet, la disponibilité en oxygène varie au cours du temps en lien avec la stratification et le brassage de la colonne d'eau, induisant une dynamique saisonnière dans la mise en place de l'oxycline et de la localisation de l'interface oxique/anoxique (colonne d'eau et interface eau-sédiment). Les sédiments dans leur verticalité sont donc soumis à des variations du gradient d'oxydoréduction (Froelich, 1979), celles-ci influençant les communautés microbiennes benthiques et notamment les méthanogènes et les méthanotrophes, sensibles à la présence/absence d'oxygène (Chaudhary *et al.*, 2013 ; Chowdhury & Dick, 2013).

Les communautés réalisant la méthanogénèse sont associées à des habitats anoxiques et elles fournissent le méthane, dont la disponibilité et la concentration sont des facteurs structurants pour les méthanotrophes utilisant ce substrat (Semrau *et al.*, 2010). Pour les méthanogènes, le substrat est aussi un paramètre important car il détermine le type de méthanogénèse qui pourra être réalisé et donc la structure de la communauté (hydrogénotrophes vs. acétotrophes). Schulz & Conrad, (1995), rapportent des variations de

concentration en méthane dans la zone benthique du Lac de Constance montrant que durant la période estivale la concentration en acétate dans les sédiments de surface (0-4 cm) peut être jusqu'à 20 fois supérieure à celle mesurée durant la période hivernale. En simulant la sédimentation d'organismes phytoplanctoniques présents durant la période estivale, ils retrouvent des concentrations en acétate similaires à ce qui est observé durant la période estivale. A l'instar de ces observations, des changements de la structure des méthanogènes ont été observées dans les sédiments du Lac Kinneret, 6 jours après la sédimentation de blooms algaux (Schwarz *et al.*, 2008). La dégradation du phytoplancton libère des molécules qui sont des précurseurs de la méthanogénèse acétoclastique et qui induisent des changements dans la structure des méthanogènes en favorisant l'ordre des *Methanosarcinales* (Schwarz *et al.*, 2008). Ces communautés fonctionnelles benthiques sont susceptibles de répondre, non seulement aux variations d'oxygénation, mais aussi aux variations d'apports de matière organique qui sont directement influencées par la dynamique biologique saisonnière lacustre. Ces études soulignent la nécessité de mettre en œuvre des approches temporelles afin de mieux appréhender cette variabilité des communautés méthanotrophes et méthanogènes.

Les objectifs de cette étude étaient (i) d'estimer les changements qualitatifs d'apports de matière organique au sédiment *via* une approche indirecte analysant la composition phénotypique des communautés microbiennes benthiques, (ii) d'étudier la variabilité temporelle de la structure et de l'abondance des communautés méthanogènes et méthanotrophes dans les sédiments du Lac du Bourget, en lien avec la dynamique saisonnière lacustre (changements d'oxygénation et d'apports de matières organiques), (iii) de caractériser la composition taxonomique des deux communautés afin d'identifier les acteurs du cycle du méthane et (iv) d'expliquer (les éventuels) changements de structure des méthanogènes et des méthanotrophes par la dynamique saisonnière des conditions environnementales.

II. Rappel concernant la stratégie d'étude et les aspects méthodologiques

Les trois stations d'échantillonnage le long du transect de distance sont les suivantes :

- Station 1 : 65 m de profondeur et soumis aux apports du principal affluent du Lac (apports allochtones). Cette station est oxygénée en permanence au cours de l'année
- Station 2 : 110 m de profondeur et non soumise aux apports de l'affluent. Cette station subit des variations d'oxygénation au cours de l'année
- Station 3 : 147 m de profondeur et le point le plus profond du Lac. Cette station est anoxique une partie de l'année et reçoit des apports principalement autochtones.

La stratégie d'échantillonnage mise en place, de même que la stratégie d'étude utilisée pour étudier la variabilité temporelle de la structure et de l'abondance des communautés méthanogènes et méthanotrophes ont été synthétisées dans le [Tableau 8](#). Par ailleurs, les détails des protocoles méthodologiques appliqués lors de cette étude sont présentés dans le chapitre II (Matériels & Méthodes) de ce manuscrit.

Tableau 8 : Tableau récapitulatif de la stratégie d'échantillonnage des analyses effectuées
Dynamique temporelle

Date d'échantillonnage	Mai, Octobre, Décembre 2011 et Février 2012
Nombre de carottes prélevées	1 carotte/station
Strates analysées	0-1 cm - 4-5 cm - 9-10 cm - 14-15 cm - 19-20 cm
Nombre de réplicats / strate	2 réplicats/strate
Communautés microbiennes et marqueurs moléculaires	méthanogènes (<i>mcrA</i>) méthanotrophes (<i>pmoA</i>)
Analyses moléculaires	Structure : génotypage (T-RFLP) Abondance : qPCR Diversité : clonage & séquençage
Caractérisation des sédiments	taux humidité, taux de matière organique, taux de carbonates, taux de carbone total, taux d'azote total, taille des particules sédimentaires, saturation en O ₂ à l'interface eau-sédiment
Composition phénotypique des communautés microbiennes benthiques	Biolog : - 3 stations d'échantillonnage - strate d'interface (0-1cm, seule strate oxygénée) - mai et octobre 2011 et février 2012

Pour complément concernant les analyses de séquençage, les séquences obtenues par clonage et séquençage des banques de clones à partir de l'amplification des gènes *mcrA* (132 clones) et *pmoA* (232 clones) ont été déposées dans la base de données GenBank, les numéros d'accès sont KR011354 à KR011484 pour les méthanogènes, et KR011489 à KR011714 pour les méthanotrophes.

III. Résultats

1. Caractérisation des stations d'échantillonnage et des sédiments échantillonnés

A l'interface eau-sédiment, la température mesurée varie entre 5°C et 5,8°C entre mai 2011 et février 2012 pour l'ensemble des stations. Les variations de saturation en oxygène fluctuent entre 64% (décembre 2011) et 78% (mai 2011 et février 2012) pour la station 1, entre 59% (octobre 2011) et 79% (février 2011) pour la station 2 et entre 0% (octobre et décembre 2011) et 80% (février 2012) pour la station 3.

Dans la verticalité des sédiments, une variabilité des paramètres environnementaux suivis est observée pour des strates localisées à la même distance de l'interface eau-sédiment (Figure 27). La variation des paramètres environnementaux suivis (notamment la teneur en carbonate ou la taille médiane des particules) semble difficilement pouvoir être soumise à une dynamique temporelle à court terme (9 mois pour la durée de l'étude présentée ici). Les variabilités temporelles observées ici semblent plutôt liées à des différences de compaction du sédiment entre les carottes échantillonnées sur le même site à deux dates différentes (Figure 28).

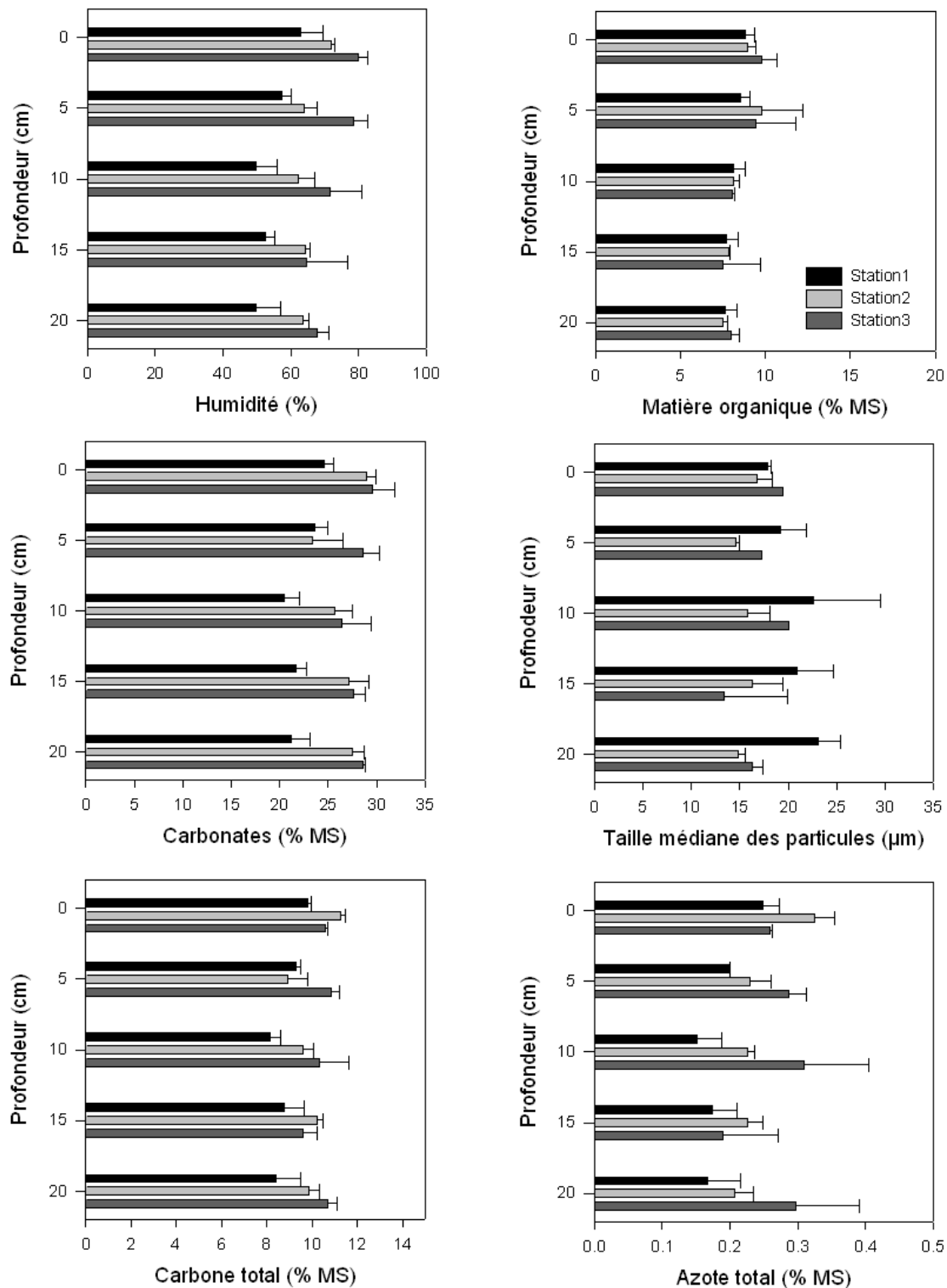


Figure 27 : Variations des paramètres physico-chimiques dans les sédiments (caractérisés pour les strates 0-1, 4-5, 9-10, 14-15 et 19-20 cm) du Lac du Bourget pour les stations 1 (noir), 2 (gris clair) et 3 (gris foncé). Les sédiments ont été caractérisés (moyenne \pm écart type, $n=4$ (mai 2011, octobre 2011, décembre 2011 et février 2012)) en termes de taux d'humidité (%), de matière organique (% de masse sèche [MS]), de carbonates (% MS), de carbone et d'azote total (% MS), ainsi que la taille médiane des particules (μm).

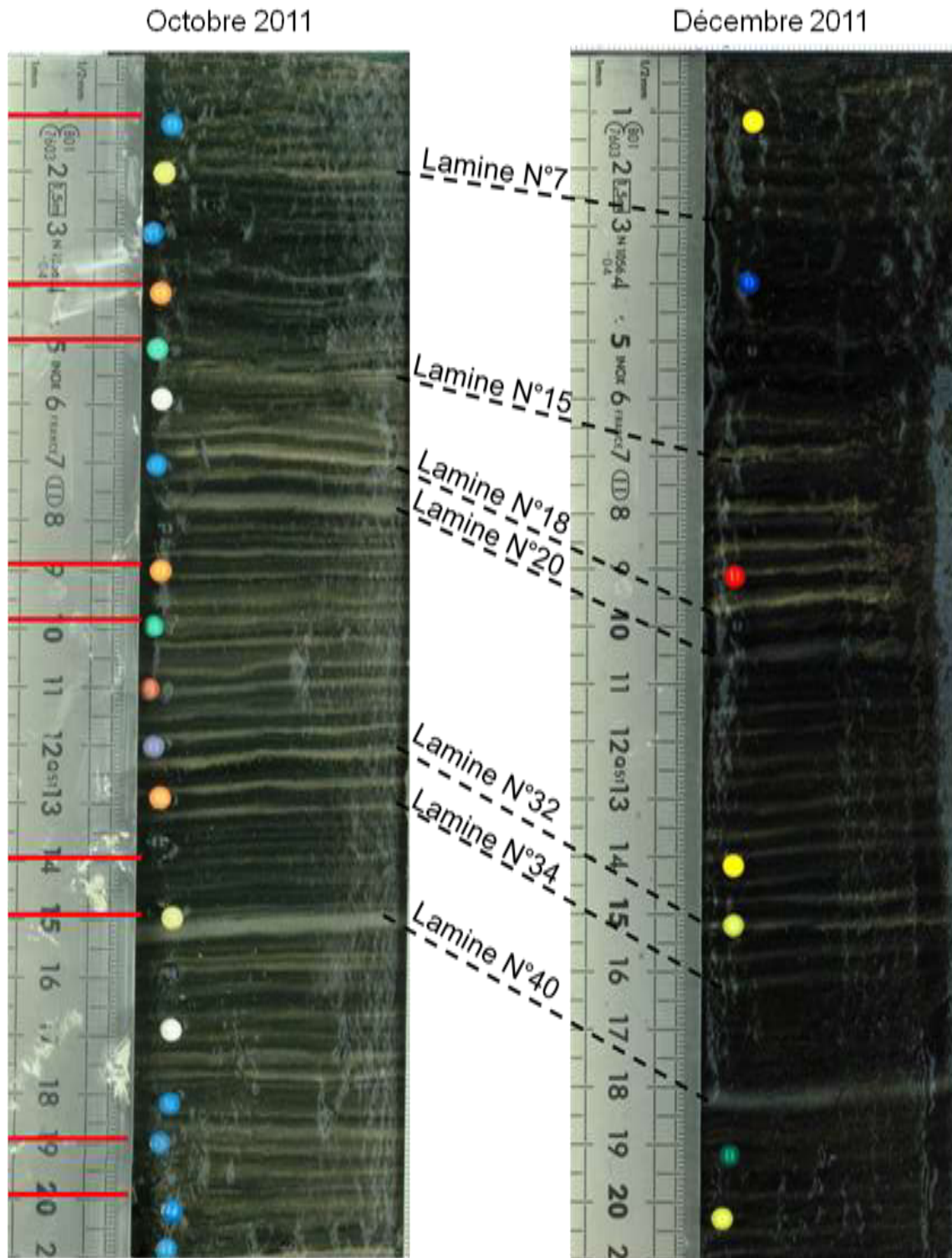


Figure 28 : Exemple de comparaison de 2 carottes sédimentaires prélevées sur la station 3 en octobre et décembre 2011 dans le Lac du Bourget. Les traits rouges représentent les strates échantillonnées entre 0 et 20 cm de profondeur sur chacune des carottes. Les traits noirs en pointillés montrent les lamine correspondant aux mêmes strates sédimentaires.

2. Analyse de la composition phénotypique des communautés microbiennes benthiques

L'analyse des Biolog met en évidence, pour l'ensemble des stations étudiées, des modifications temporelles dans l'utilisation des substrats carbonés par les communautés microbiennes benthiques.

Les axes 1 et 2 de l'analyse en composantes principales (ACP) des profils phénotypiques permettent d'expliquer 86% de la variance observée (Figure 29). L'axe 1 discrimine l'utilisation des acides aminés, polymères et carbohydrates de l'utilisation des acides carboxyliques, composés phénoliques et amines par les communautés étudiées. Les communautés microbiennes présentes dans les échantillons de mai 2011 utilisent principalement les polymères ($28 \pm 2\%$), les acides aminés ($24 \pm 4\%$) et des carbohydrates ($22 \pm 1\%$) (Figure 29), alors qu'à partir d'octobre 2011 et en février 2012 les différents substrats sont utilisés par les communautés microbiennes en proportions relativement similaires ($16,7 \pm 2\%$, Figure 29).

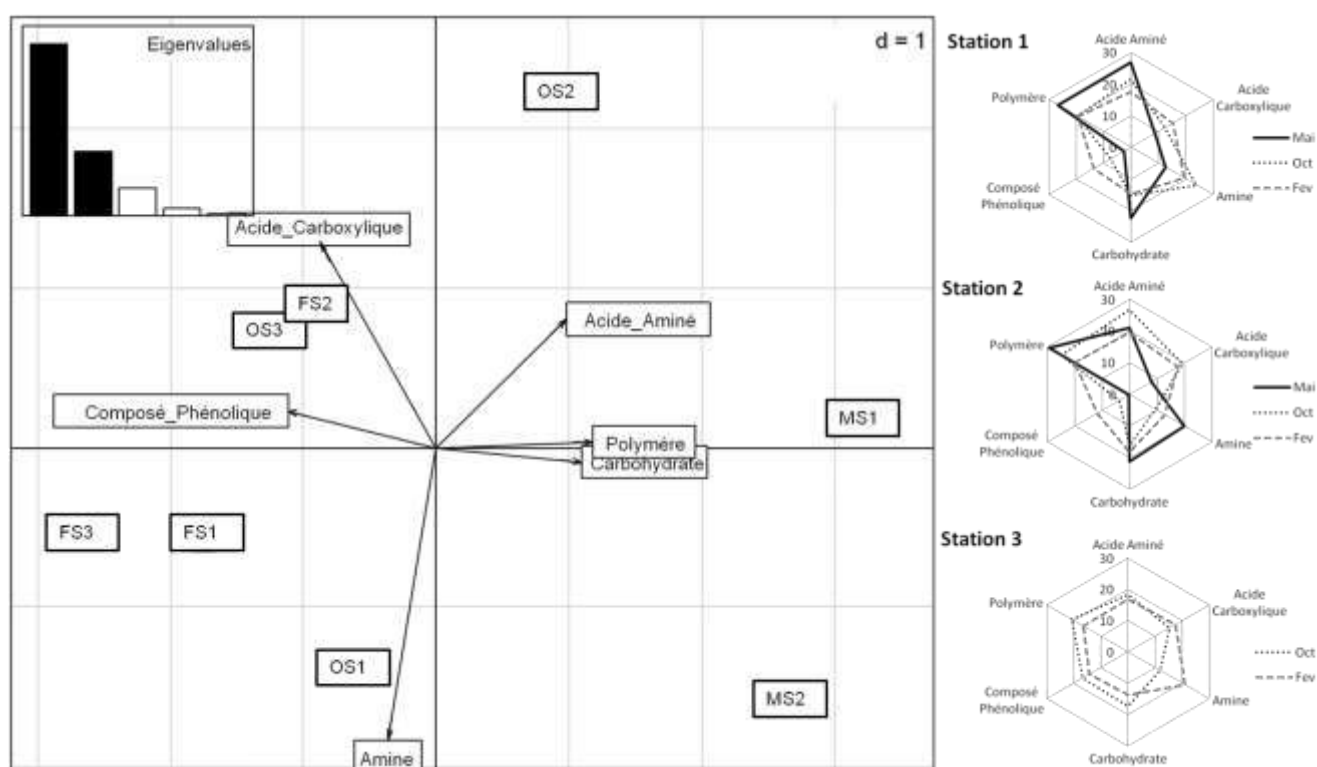


Figure 29 : ACP effectuée avec le pourcentage de l'activité microbienne de chaque guild (P_x) après 7 jours d'incubation. L'axe 1 représente 62,4 % et l'axe 2, 23,6% de la variance. Les abréviations M, O et F représentent les mois de prélèvements à savoir Mai 2011, Octobre 2011 et Février 2012 et S1, S2 et S3 les stations d'échantillonnage. A droite, diagramme en étoile représentant l'utilisation des guildes carbonées (en %) pour chacune des dates et stations d'échantillonnage.

3. Structure, diversité et abondance des communautés méthanogènes

i. Analyse de la variabilité spatio-temporelle de la structure

L'analyse T-RFLP des méthanogènes (gène *mcrA*) a révélé 21 T-RF. Des différences significatives dans la structure des méthanogènes ont été observées entre les stations ($p < 0,006$) par conséquent la variabilité temporelle a été étudiée au sein de chacune des stations. La variabilité temporelle de la structure des méthanogènes n'est significative que pour la station 2 (ANOSIM, $p < 0,036$, Figure 29). Deux sous groupes ont pu être distingués dans la verticalité, le premier regroupant les échantillons de la strate d'interface (0-1 cm) (moyenne \pm SD des similarités de Bray-Curtis, 38 ± 23 % de similarité entre les 4×2 échantillons indépendamment de la date considérée) et le second, les échantillons des autres strates (comprises entre 4 et 20 cm) de cette station ((moyenne \pm SD 60 ± 33 % de similarité).

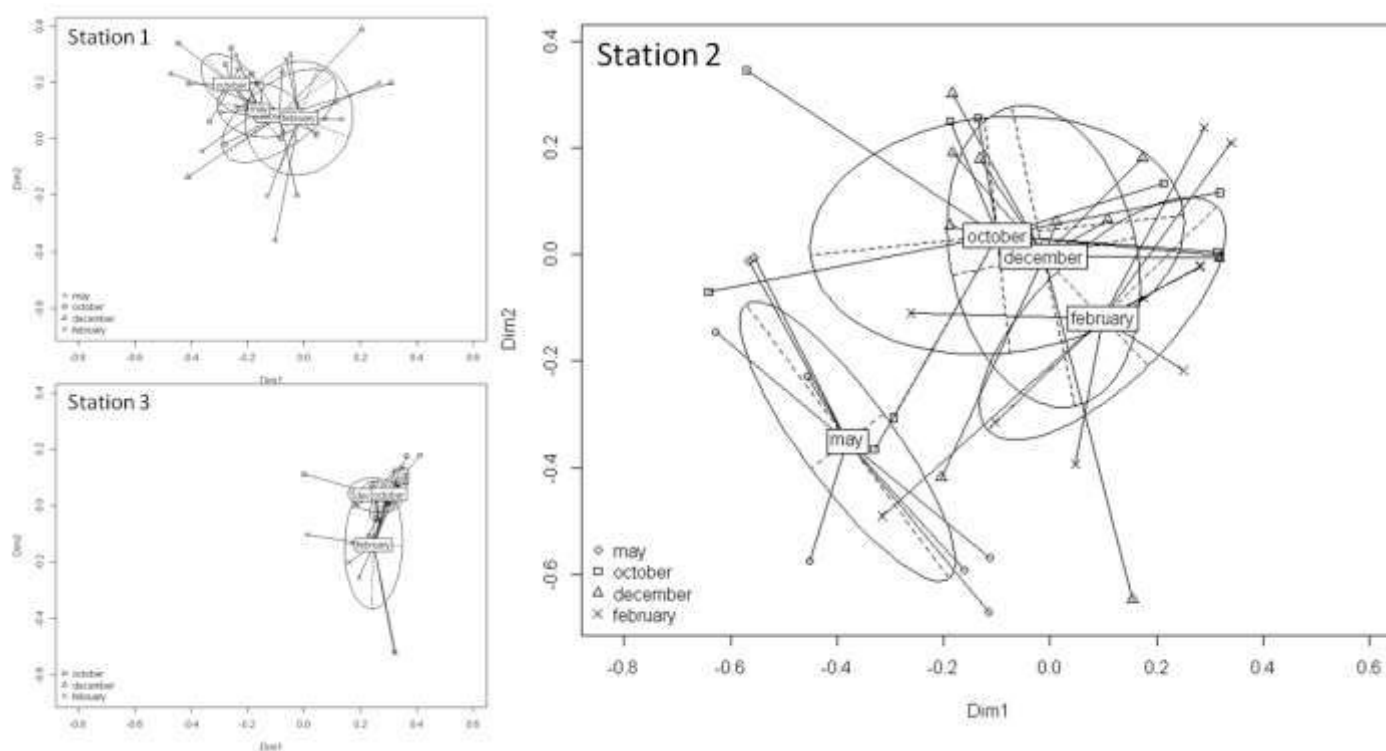


Figure 30 : nMDS réalisé à partir des distances de Bray – Curtis pour les méthanogènes (stress = 0,20). Pour chaque station, les dates sont représentées avec des cercles pour mai 2011, des carrés pour octobre 2011, des triangles pour décembre 2011 et des croix pour février 2012.

Une analyse SIMPER a été effectuée afin d'identifier les T-RF contribuant cette variabilité temporelle (Tableau 9) montrant que les T-RF 40 et 288 sont responsables, à eux seuls, de 50% de la variabilité temporelle (Tableau 9). Si l'on considère uniquement la strate d'interface (0-1 cm, Tableau 9), ces T-RF présents contribuent à 75,9% de la variabilité temporelle. Les RFI des T-RF 40 et 288 passent de 46,9% en mai à 6,3% en février et de 11,4% en mai à 56,7% en février, respectivement (Tableau 9).

Tableau 9 : Variation temporelle de l'intensité relative de fluorescence (RFI, légende dans le tableau) de la structure des méthanogènes, dans la strate d'interface (0-1 cm) des sédiments de la station 2, en mai 2011, octobre 2011, décembre 2011 et février 2012. Pour chaque T-RF, la contribution à la variabilité temporelle (%), basée sur l'analyse SIMPER) et son affiliation phylogénétique ont été indiqués.

Légende	T-RF	Station 2				Contribution (%)	Affiliation
		Mai	Oct	Dec	Fev		
Absent	40					26,5	Indéterminé
RFI < 5%	88					8,8	<i>Methanoregulaceae</i>
5% < RFI < 10%	212					0,2	Non identifié
10% < RFI < 20%	224					3,4	Non identifié
20% < RFI < 30%	288					23,5	<i>Methanoregulaceae</i>
30% < RFI < 40%	578					7,8	<i>Methanoregulaceae</i>
RFI > 40%	752					5,8	<i>Methanoregulaceae</i>

Les T-RF liés à la variabilité temporelle sur la station 2 présentent les affiliations suivantes (digestion *in silico* des séquences partielles de *mcrA*) : le T-RF 40 est affilié aux ordres des *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales* et *Methanobacteriales*, les T-RF 88, 288, 578 et 752 à la famille des *Methanoregulaceae*. Les T-RF 212 et 224 n'ont pu être identifiés. Ainsi, sur la station 2, la famille des *Methanoregulaceae* contribue, au moins, à 46% de la variabilité temporelle (Tableau 9).

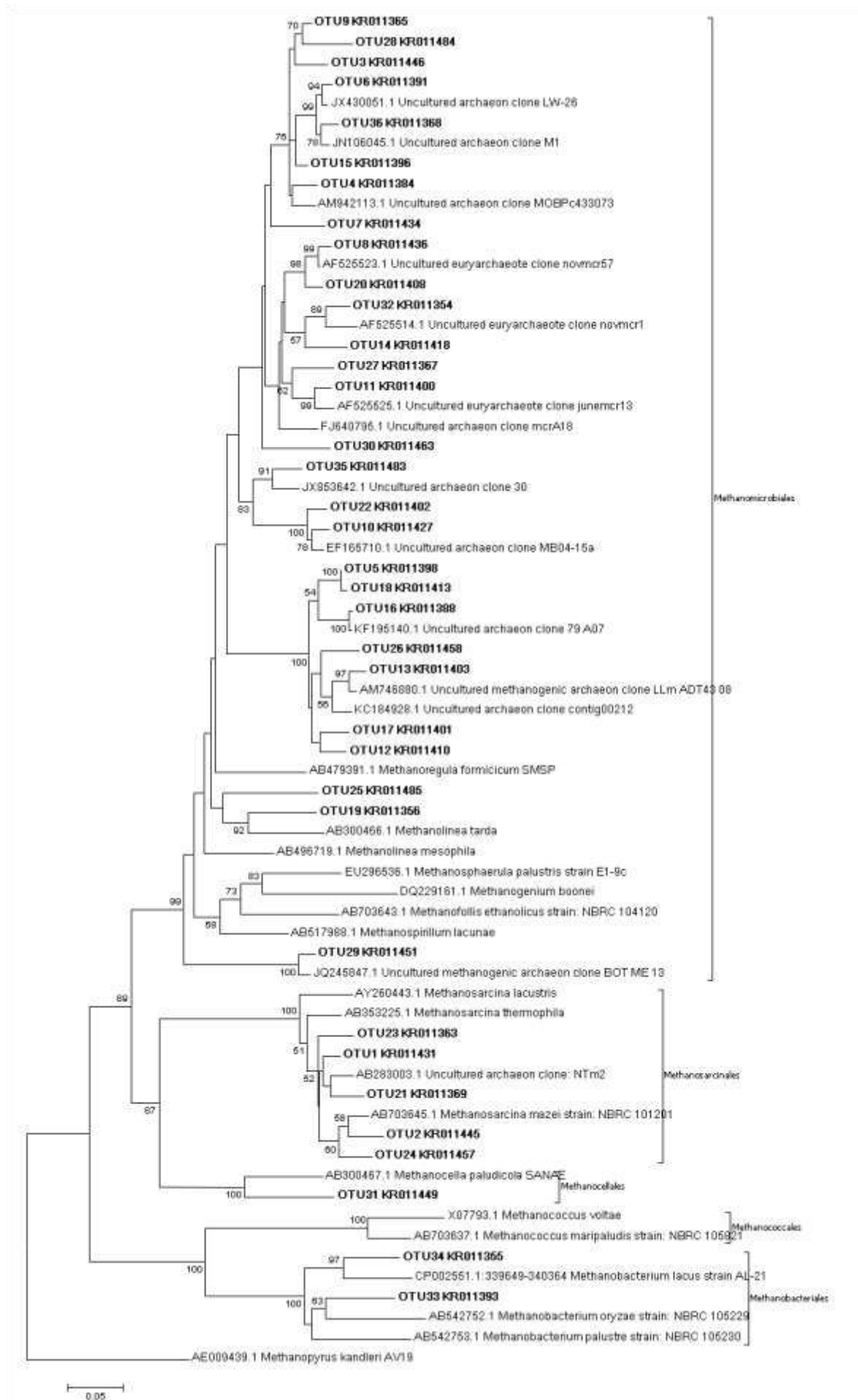
Sur cette station, une analyse de redondance (RDA) montre que la saturation en oxygène à l'interface eau-sédiment ($p = 0,02$), le taux de matière organique ($p = 0,02$) et le taux d'azote total ($p < 0,0001$) sont des paramètres expliquant la variabilité temporelle de la structure de cette communauté.

ii. Composition taxonomique des méthanogènes

Les 132 séquences analysées ont été regroupées en 36 OTU à un seuil de 95% (Figure 31). Parmi elles, 28 OTU (88% des clones) ont été affiliées aux *Methanomicrobiales* (*Methanoregula*, *Methanolinea* et *Methanospirillum*), 5 OTU (9% des clones) aux *Methanosarcinales* (*Methanosarcina*), 2 OTU (2% des clones) aux *Methanobacteriales* (*Methanobacterium*) et 1 OTU (1% des clones) aux *Methanocellales* (*Methanocella*).

Les clones affiliés aux *Methanomicrobiales* ont été identifiés comme ayant les T-RFs 40, 88, 288, 494, 578 et 752, ceux affiliés aux *Methanosarcinales* aux T-RFs 40, 148 et 290 et ceux affiliés aux *Methanobacteriales* aux T-RFs 40 et 244. Les T-RF 534 et 566, n'ont pas été retrouvés dans notre banque de clones, toutefois des simulations de restrictions enzymatiques avec le logiciel TRiFLe ont permis d'affilier ces 2 T-RF à *Methanococcus* sp. Les autres T-RF détectés en géotypage (174, 178, 212, 224, 326, 364, 378, 392 et 408) n'ont pu être affiliés à aucun taxa méthanogènes.

Figure 31 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences issues du clonage du gène *mcrA*. L'arbre a été construit en utilisant la méthode du *Neighbor-joining*, et enraciné avec *Methanopyrus kandlerii*. Seules les valeurs de bootstraps supérieures à 50 (1 000 réplicats) sont indiquées.



iii. Abondance des méthanogènes

L'abondance des méthanogènes estimée en qPCR est présentée avec une abondance exprimée en nombre de copies de *mcrA* par gramme de sédiment frais, mais les tendances observées pour des abondances exprimées en nombre de copies de *mcrA* par gramme de sédiment sec et par gramme de matière organique sont similaires. Ces abondances varient entre 1.10^6 et 2.10^8 , entre 7.10^6 et 1.10^8 et entre 2.10^6 et 1.10^8 copies par gramme de sédiments frais pour les stations 1, 2 et 3 respectivement. Pour chaque station l'abondance des méthanogènes reste constante avec la profondeur sédimentaire (Figure 31).

Sur la station 3, l'abondance des méthanogènes tend à augmenter à l'interface eau-sédiment (0–1 cm) lors de la période de stratification lacustre (Figure 32). L'abondance augmente pendant la période d'anoxie passant de $7,09.10^6 \pm 8,79.10^6$ copies/gramme de sédiments frais en octobre à $7,44.10^7 \pm 1,29.10^7$ en février (Figure 32). Pour les stations 1 et 2, l'abondance ne montre pas d'important changement dans la strate d'interface.

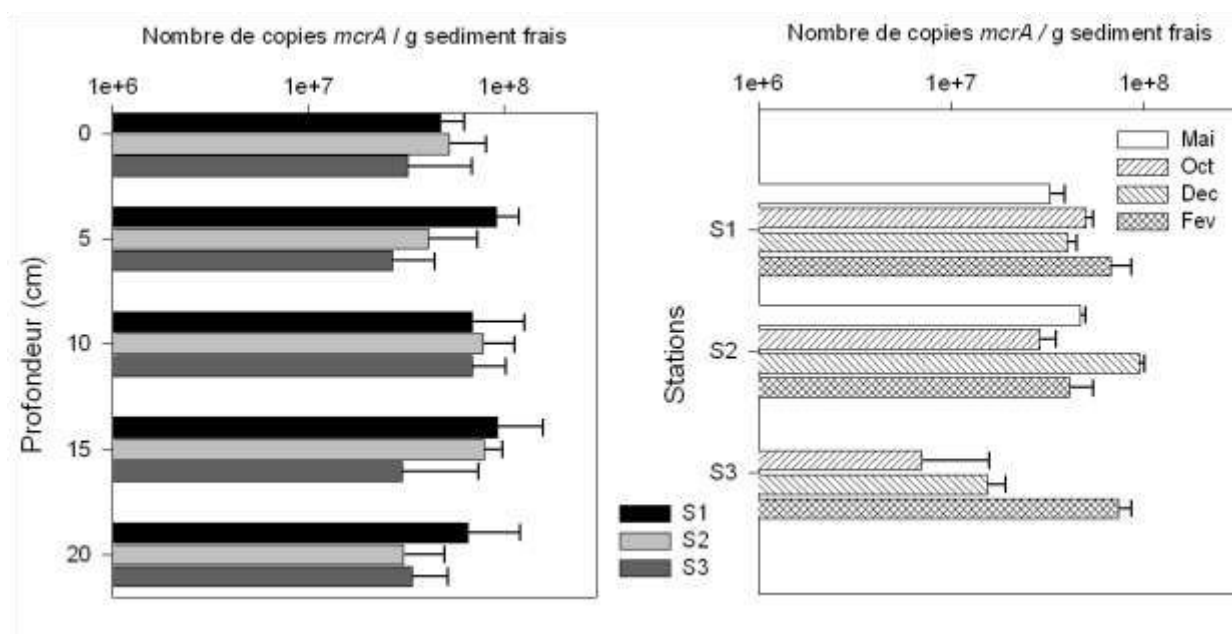


Figure 32 : Représentation de l'abondance des méthanogènes analysés par PCR quantitative sur le gène *mcrA*, exprimé en nombre de copies de *mcrA* par gramme de sédiments frais. A gauche abondance des méthanogènes en fonction de la profondeur sédimentaire entre 0 et 20 cm pour chaque station avec en noir la station 1, en gris clair la station 2 et en gris foncé la station 3. A droite, représentation des variations temporelles de l'abondance des méthanogènes dans la strate d'interface uniquement (0-1 cm) pour chaque station (S1 : station1, S2 : station 2 et S3 : station 3) pour les mois de mai 2011, octobre 2011, décembre 2011 et février 2012.

4. Structure, diversité et abondance des méthanotrophes

i. Analyse de la structure et de la variabilité spatio-temporelle

L'analyse T-RFLP (gène *pmoA*) a révélé 23 T-RF pour les méthanotrophes. Des différences significatives dans la structure des méthanotrophes sont observées entre les 3 stations (ANOSIM, $p < 0,015$) en conséquence la variabilité temporelle a été étudiée au sein de chacune des stations.

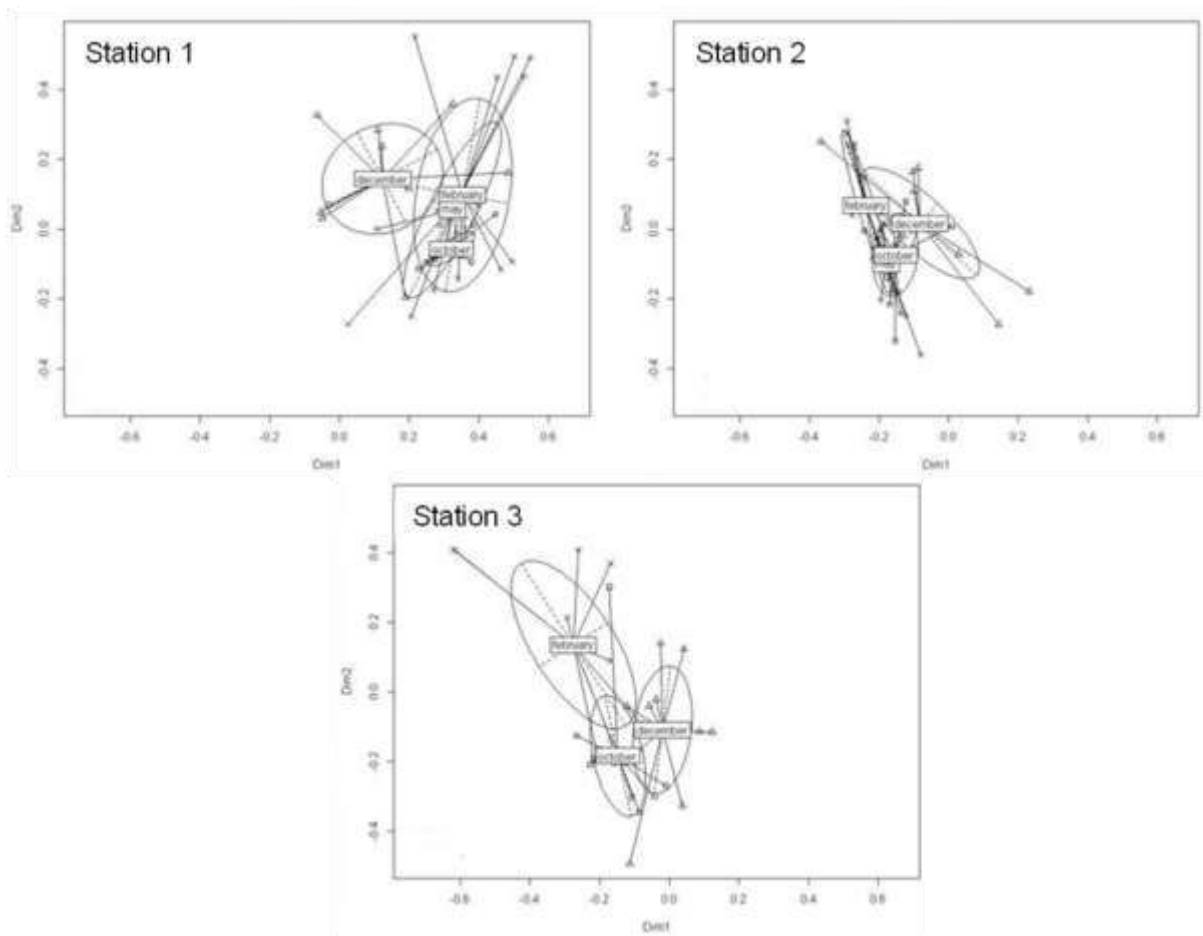


Figure 33 : Pour chaque station, représentation d'un nMDS à partir des distances de Bray–Curtis pour les méthanotrophes (stress = 0,20). Les dates sont représentées avec des cercles pour mai 2011, des carrés pour octobre 2011, des triangles pour décembre 2011 et des croix pour février 2012.

Une variation temporelle significative de la structure des méthanotrophes est observée pour chacune des 3 stations (ANOSIM, $p < 0,0032$, **Figure 33**). Deux sous groupes ont pu être distingués dans la verticalité : le premier regroupant les échantillons des strates 0-1 et 4-5 cm

(moyenne \pm SD des similarités de Bray-Curtis, Station 1 : 31 ± 19 % de similarité, Station 2 : 21 ± 13 % et Station 3 : 34 ± 24 %) et le second, les échantillons des autres strates (9-20 cm, Station 1 : 65 ± 20 % de similarité, Station 2 : 67 ± 16 % et Station 3 : 63 ± 18 %).

L'analyse SIMPER effectuée sur chaque station montre que la variabilité temporelle de la structure des méthanotrophes aux 3 stations est induite par les mêmes T-RF : T-RF 246 et 244 (affiliés aux méthanotrophes de Type II), 514 (affilié à *Methylobacter sp.*) et 80 et 228 (affiliés à *Methylococcus sp.*) qui représentent 80%, 78% et 77% de la variabilité temporelle pour les stations 1, 2 et 3 respectivement (Tableau 10). Pour la station 1, les principaux contributeurs à cette variabilité sont les T-RF 228 et 244 (44%), tandis que pour les stations 2 et 3, ce sont les T-RF 246 et 514 (54% pour la station 2 et 55% pour la station 3).

Tableau 10 : Analyse SIMPER décrivant la contribution des T-RFs méthanotrophes à la variabilité temporelle pour chacune des stations. Pour chaque T-RF, est indiquée sa contribution (en %) à la variabilité temporelle pour chacune des stations étudiées.

T-RF	Station 1	Station 2	Station 3	Affiliation
80	10,37	7,84	7,21	<i>Methylococcus sp.</i>
84		2,62	1,62	<i>Methylobacter sp.</i>
128		0,08	1,03	Type I
162	4,58	0,57	0,91	Type Ib
176	2,49	2,30	7,00	Type Ia
186	0,32		0,35	Type I
190	0,37		0,40	Type I
212	3,62	3,11	2,58	NC10
228	23,94	4,43	4,13	<i>Methylococcus sp.</i>
236	0,95			<i>Methylobacter sp.</i>
242	2,13		0,51	Type II
244	20,43	12,55	10,37	Type II
246	14,7	27,16	29,29	Type II
280		1,27	1,31	Type I
298			0,36	Type I
336	1,75	2,83	1,3	<i>Methylobacter sp.</i>
346			1,03	Type Ib
350			0,70	Type Ib
354	2,2	4,67	2,36	Type I
390		0,42		Type I
442	1,43	3,75	0,93	Type Ib
478			0,89	Type Ib
514	10,74	26,4	25,7	<i>Methylobacter sp.</i>

On observe des variations importantes dans l'intensité relative de fluorescence (RFI) des T-RF 246 et 514, dans les strates de surface des stations 2 et 3. La RFI du T-RF 246 diminue entre mai et février (environ 30% pour les 2 stations) alors que celle du T-RF 514 augmente de 30 % sur la station 2 et de plus de 50% sur la station 3 aux mêmes périodes (Tableau 11). Quant à la station 1, la RFI du T-RF 228 est comprise entre 14% (octobre) et 43% (mai) sur la station 1, alors qu'il a une RFI comparativement très faible sur les stations 2 et 3 (entre 1,8% et 7,4%). La RFI du T-RF 244 est faible lors des périodes fortement oxygénées (en mai et février RFI < 20%, Tableau 11) et augmente lorsque la saturation en oxygène diminue.

Tableau 11 : Variabilité temporelle de l'intensité relative de fluorescence (RFI) des T-RF, dans les 5 premiers centimètres des sédiments (strates 0-1 et 4-5 cm) pour chaque station d'échantillonnage.

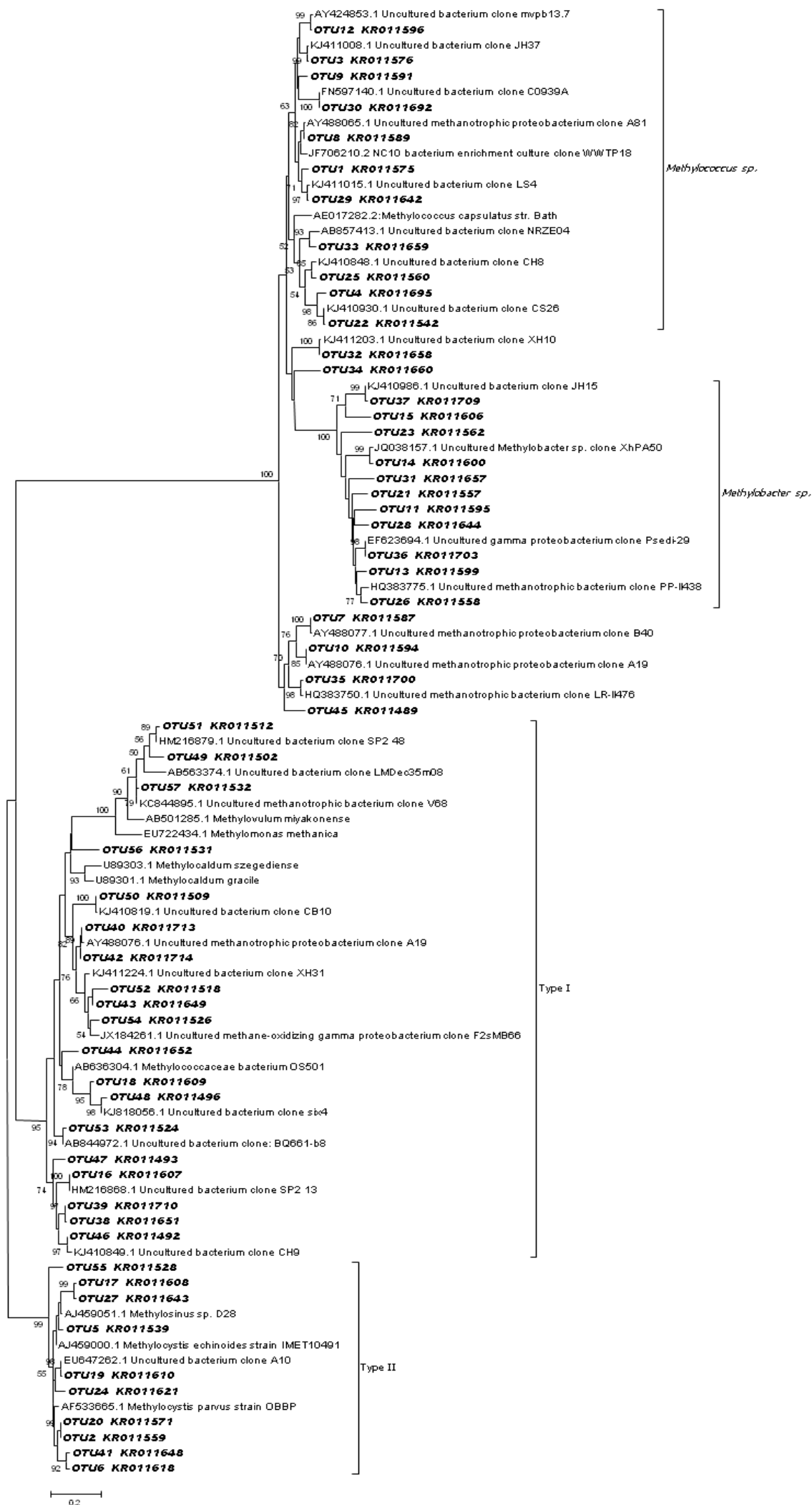
		Station 1			
T-RF	Affiliation	Mai-11	Oct-11	Dec-11	Fev-12
80	<i>Methylococcus sp.</i>				
176	Type Ia				
212	NC10				
228	<i>Methylococcus sp.</i>				
236	<i>Methylobacter sp.</i>				
242	Type II				
244	Type II				
246	Type II				
336	<i>Methylobacter sp.</i>				
354	Type I				
514	<i>Methylobacter sp.</i>				

		Station 2			
T-RF	Affiliation	Mai-11	Oct-11	Dec_11	Fev-12
80	<i>Methylococcus sp.</i>				
128	Type I				
176	Type Ia				
212	NC10				
228	<i>Methylococcus sp.</i>				
244	Type II				
246	Type II				
336	<i>Methylobacter sp.</i>				
354	Type I				
390	Type I				
442	Type Ib				
514	<i>Methylobacter sp.</i>				

T-RF	Affiliation	Station 3			Légende
		Oct-11	Dec-11	Fev-12	
80	<i>Methylococcus sp.</i>				NA
84	<i>Methylobacter sp.</i>				RFI < 5%
212	NC10				5% < RFI < 10%
228	<i>Methylococcus sp.</i>				10% < RFI < 20%
244	Type II				20% < RFI < 30%
246	Type II				30% < RFI < 40%
336	<i>Methylobacter sp.</i>				RFI > 40%
354	Type I				
442	Type Ib				
514	<i>Methylobacter sp.</i>				

Pour chaque station, la relation entre les paramètres environnementaux et la structure des méthanotrophes a été analysée par une analyse de redondance (RDA). Ainsi, pour la station 1 seul le taux d'azote total ($p = 0,017$) s'est révélé significatif. Pour la station 2, les taux d'humidité, de carbone et d'azote ($p = 0,017$, $p = 0,0006$ et $p < 0,0001$ respectivement), de même que la taille médiane des particules sédimentaires ($p = 0,001$) sont significativement corrélés. Enfin pour la station 3, la saturation en oxygène ($p = 0,03$) et la taille médiane des particules sédimentaires ($p < 0,0001$) sont significatives.

Figure 34 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences issues du clonage du gène *pmoA*. L'arbre a été construit en utilisant la méthode du *Neighbor-joining*. Seules les valeurs de bootstraps supérieures à 50 (1 000 réplicats) sont indiquées.



ii. Composition taxonomique des méthanotrophes

Des 232 séquences analysables à partir du clonage, 57 OTU méthanotrophes (Figure 34) sont identifiées à un seuil de 93%. Parmi celles-ci, 11 OTU (10% des clones) sont affiliées à *Methylobacter sp.*, 11 OTU (44% des clones) à *Methylococcus sp.*, 10 OTU (25% des clones) au Type II (*Methylocystis* et *Methylocinus*) et 25 OTU (21% des clones) au Type I (*Methylogeae*, *Methylocaldum*, *Methylomicrobium*). Les T-RFs 84, 236, 336 et 514 ont été affiliés à *Methylobacter sp.*, les T-RF 162, 346, 350, 442 et 478 aux méthanotrophes de Type Ib, le T-RF 80, 176 et 228 aux méthanotrophes de Type Ia, le T-RF 212 à la division NC10 et le T-RF 242, 244 et 246 aux méthanotrophes de Type II. Les autres T-RFs (186, 280, 298, 354 et 390) n'ont pas pu être identifiés.

iii. Abondance des méthanotrophes

L'abondance des méthanotrophes estimée en qPCR est présentée avec une abondance exprimée en nombre de copies de *pmoA* par gramme de sédiment frais, mais les tendances observées pour des abondances exprimées en nombre de copies de *pmoA* par gramme de sédiment sec et par gramme de matière organique sont similaires. Ces abondances varient entre 2.10^4 et 2.10^7 , entre 2.10^5 et 5.10^6 et entre 5.10^4 et 7.10^6 copies de gène *pmoA* par gramme de sédiment frais pour les stations 1, 2 et 3 respectivement. Pour l'ensemble des stations étudiées, on observe une diminution de l'abondance des méthanotrophes dans la profondeur sédimentaire (Figure 35) d'environ 1 log entre l'interface (0-1 cm) et la strate la plus profonde (19-20 cm).

A la station 3 l'abondance des méthanotrophes tend à augmenter à l'interface eau-sédiment entre décembre et février passant de $5,41.10^5 \pm 2,43.10^5$ à $7,22.10^6 \pm 3,86.10^6$ (Figure 35). A l'inverse les stations 1 et 2, il n'apparaît pas de variation temporelle significative de l'abondance dans la strate d'interface. A 4-5 cm de profondeur, l'abondance des méthanotrophes est toujours inférieure en février (S1 : $5,59.10^5 \pm 1,92.10^5$, S2 : $2,04.10^5 \pm 6,86.10^4$ et S3 : $1,95.10^5 \pm 5,09.10^5$) par rapport aux autres dates, avec environ 1 log d'écart (S1 : $3,59.10^5 \pm 1,54.10^6$, S2 : $1,47.10^5 \pm 2,76.10^5$ et S3 : $2,14.10^6 \pm 1,74.10^6$) et ceci sur les 3 stations étudiées.

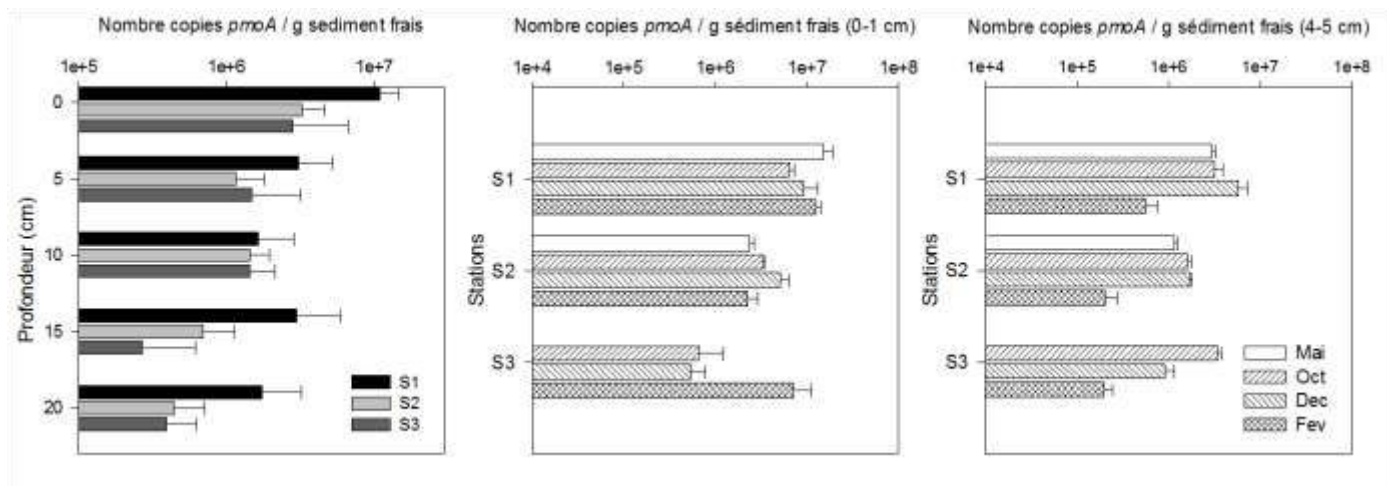


Figure 35 : Représentation de l'abondance des méthanotrophes analysés par PCR quantitative sur le gène fonctionnel *pmoA*, exprimé en nombre de copies de *pmoA* par gramme de sédiment frais. A gauche, abondance des méthanotrophes en fonction de la profondeur sédimentaires entre 0 et 20 cm pour chaque station avec en noir la station 1, en gris clair la station 2 et en gris foncé la station 3. Au centre représentation des variations temporelles de l'abondance des méthanotrophes dans la strate d'interface (0-1 cm) et à droite dans la strate 4-5 cm pour chaque station (S1 : station 1, S2 : station 2 et S3 : station 3) pour les mois de mai 2011, octobre 2011, décembre 2011 et février 2012.

5. Co-structuration entre méthanogènes et méthanotrophes

L'analyse de co-structuration entre les 2 communautés a été réalisée indépendamment sur chacune des stations, et une concordance significative a été observée dans chaque cas (analyse Procrustéenne, $p = 0,007$ et $m12 = 0,85$ pour les stations 1 et 2 et $p = 0,007$ et $m12 = 0,81$ pour la station 3). La représentation graphique de l'analyse de co-structuration permet d'observer une concordance plus importante en décembre comparativement aux autres dates échantillonnées, où la distance entre la représentation graphique des communautés méthanotrophes par rapport aux méthanogènes augmente (Figure 36).

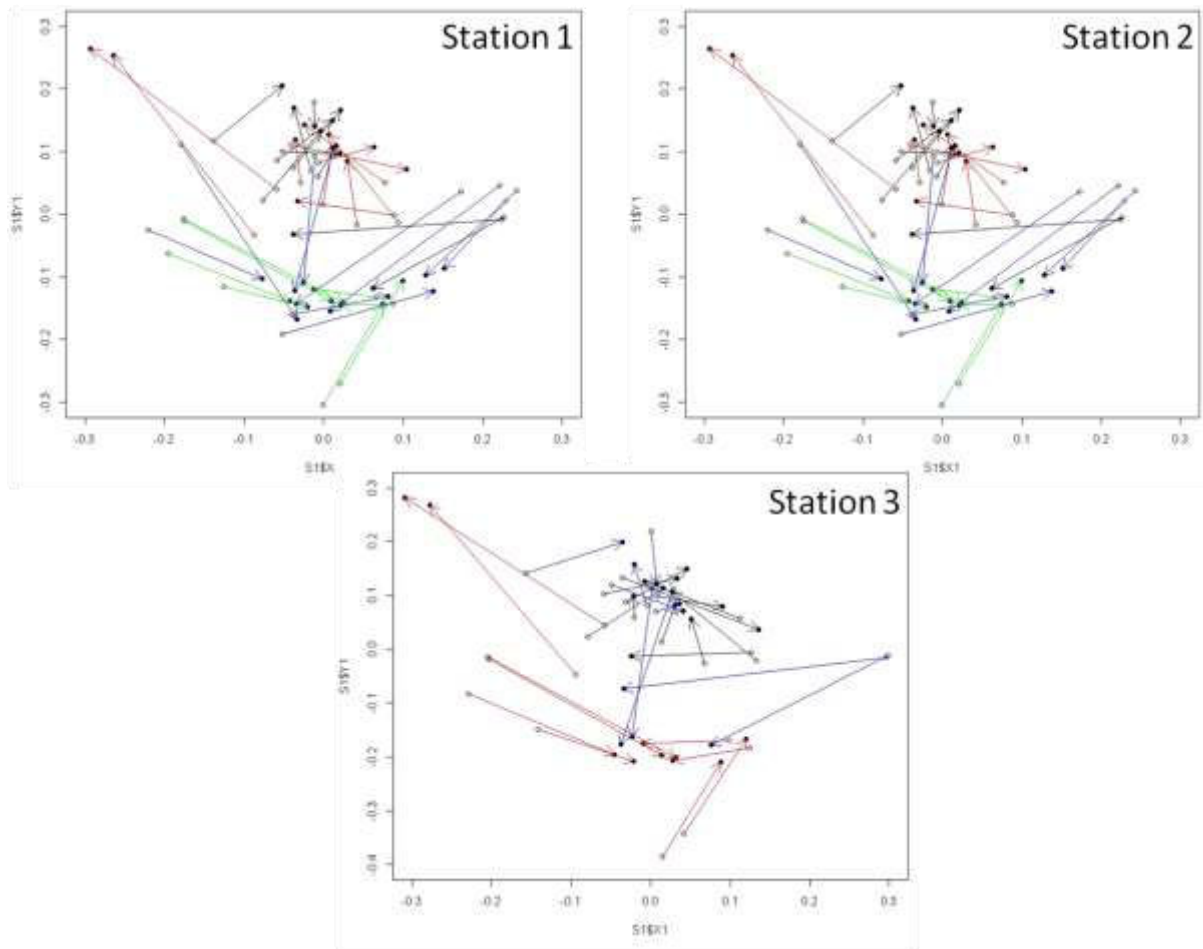


Figure 36 : Représentation bi-dimensionnelle de la solution graphique de l'analyse procrustéenne. La structure des méthanogènes (ronds noirs) et celle des méthanotrophes (les ronds blancs) sont représentées. Les dates d'échantillonnages sont indiquées par la couleur des flèches (mai 2011 : vert, octobre 2011 : rouge, décembre 2011 : noir et février 2012 : bleu).

IV. Discussion

Nos résultats montrent que la structure et l'abondance des méthanotrophes ont une dynamique temporelle, en lien avec les changements de stratifications lacustres. Pour les méthanogènes seuls des changements ponctuels dans leur structure et leur abondance ont été observés et uniquement dans la strate d'interface eau-sédiment. Ces modifications ponctuelles semblent en lien à la fois avec des changements d'oxygénation dans la strate d'interface mais aussi avec des modifications d'apport de matières organiques.

1. Influence de l'oxygène sur les méthanogènes

Pour les méthanogènes, il semble que la structure de cette communauté ne soit pas fortement impactée par les variations d'oxygénation. Toutefois, en l'absence de données en mai 2011, où la station 3 est ré-oxygénée depuis 4 mois (saturation en oxygène à 50% en mai 2011), il est possible d'envisager que la structure des méthanogènes puisse subir des modifications, bien que nous n'en n'ayons pas observé en février 2012 (saturation en oxygène à $\approx 80\%$). Et ce, d'autant plus que des études montrent que les méthanogènes sont capables de s'adapter à des conditions oxygénées (Angel *et al.*, 2011 ; Grossart *et al.*, 2011 ; Tang *et al.*, 2014 ; Bogard *et al.*, 2014). Angel *et al.* (2011) ont identifié *Methanosarcina* comme étant capable de supporter des périodes d'oxygénation, or celle-ci est présente dans les sédiments du Lac du Bourget. Mais ce n'est pas le seul taxa à pouvoir s'adapter à des conditions d'oxygénation, *Methanoregula boonei* possède aussi les enzymes nécessaires à cette adaptation (Bräuer *et al.*, 2006), or cette espèce a été identifiée dans notre banque de clones. Même si la structure des méthanogènes ne change pas sur la station la plus profonde en février 2012 lors de la ré-oxygénation des sédiments, l'abondance de cette communauté augmente dans la strate d'interface (0-1 cm) lors de la période d'anoxie (entre octobre et février) montrant des conditions favorables à cette communauté. Ceci étant en accord avec les préférences écologiques connues des méthanogènes (Garcia *et al.*, 2000).

2. La dynamique des méthanogènes sous contrôle de la matière organique

Les variations de la structure des méthanogènes sont expliquées par les taux de d'azote total et de matière organique, en plus de la saturation en oxygène vue précédemment. Comme décrit dans le chapitre précédant, le taux de matière organique est explicatif d'un changement de la structure des méthanogènes à l'échelle spatiale. Il n'est pas impossible que les taux de matière organique et d'azote total soient explicatifs d'un changement de structure des méthanogènes dans la verticalité des sédiments du Lac du Bourget, plutôt qu'à une dynamique temporelle. Ceci semble confirmé par la [Figure 27](#) sur laquelle on peut observer une tendance à la diminution de ces 2 paramètres dans la verticalité des sédiments. Toutefois, il est possible que les changements de la structure de cette communauté puissent être expliqués par des changements qualitatifs de la matière organique (Schwarz *et al.*, 2008). Les variations de

structure des méthanogènes observées sur la station 2 montrent clairement un changement de la communauté entre la période printanière oxygénée (mai) et la période hivernale (octobre à février).

Ces 2 périodes sont aussi caractérisées par un changement dans l'utilisation des sources carbonées (Biolog) passant de l'utilisation de carbohydrates (en mai) aux amines et acides carboxyliques (en février). Grover & Chzanowski, (2000) ont observé sur le bactérioplancton de lacs tempérés Nord Américains une utilisation des carbohydrates en période estivale après le bloom algal et une utilisation des amines et acides carboxyliques en période hivernale. Sur le Lac du Bourget le pic printanier de phytoplancton a été atteint début avril 2011 (Jacquet *et al.*, 2012) laissant place à un pic de zooplancton début mai 2011. Ainsi la sédimentation du phytoplancton et le broutage de celui-ci par le zooplancton sont à l'origine de la libération de carbohydrates facilement assimilables par les communautés microbiennes benthiques (Grover & Chzanowski, 2000). En février 2012, on observe une utilisation relativement équivalente des différents substrats en lien avec une faible abondance des communautés planctoniques durant la période hivernale (Jacquet *et al.*, 2012). De plus Schwarz *et al.* (2008), ont montré, dans le Lac Kinneret, que 6 jours après la déposition d'algues dans les sédiments, les taux d'acétate et de propionate augmentaient, de même que l'abondance relative des *Methanosaetaceae* (acétotrophes).

Les changements de structure des méthanogènes observés sur la station 2 sont probablement dus à un changement des apports de matières organiques liés à une variation saisonnière des apports planctoniques. L'impact de ces changements est notable en particulier dans la strate de surface (0-1 cm) comme le montre l'amplitude des variations temporelles de la structure des méthanogènes.

3. Variations temporelles de la structure et de l'abondance des méthanotrophes

Dans notre étude, les variations de structure des méthanotrophes sont expliquées par plusieurs paramètres environnementaux, toutefois, comme pour les méthanogènes il est possible que certains paramètres, tels que les taux de d'azote total et d'humidité, ne soient pas explicatifs d'une dynamique temporelle de la structure des méthanotrophes mais plutôt d'un changement lié à la verticalité des sédiments (Figure 27).

Dans les sédiments du Lac du Bourget, les méthanotrophes de Type I et II ont été identifiés avec une dominance des méthanotrophes de Type I et notamment de *Methylobacter* dans les stations les plus profondes (stations 2 et 3) alors que *Methylococcus* est plutôt dominant sur la station 1. Cette opposition dans la distribution entre *Methylobacter* et *Methylococcus* confirme les résultats obtenus dans les sédiments du Lac Constance (Pester *et al.*, 2004 ; Deutzman *et al.*, 2011). Les méthanotrophes de Type Ia (*Methylococcus* / *Methylocaldum*) représentent en général une faible proportion dans les sédiments lacustres comparativement à *Methylobacter* (Borrel *et al.*, 2011), leur présence a été plus souvent repérée dans les rizières (Shrestha *et al.*, 2008 ; Ma & Lu, 2011 ; Ma *et al.*, 2013). La présence importante de *Methylococcus* sur la station 1 peut être expliquée par la localisation de celle-ci, soumise aux apports allochtones du principal affluent du Lac du Bourget, et donc à des apports en nutriments beaucoup plus variables comparativement aux stations 2 et 3 (Sobek *et al.*, 2009 ; Deutzman *et al.*, 2011). En revanche, aux stations 2 et 3 la présence de *Methylococcus* est faible et les variations temporelles observées montrent une opposition d'abondance relative entre *Methylobacter* (Type I) et *Methylosinus* / *Methylocystis* (Type II), à l'instar des travaux menés sur les rizières rapportant aussi cette opposition (Shrestha *et al.*, 2008 ; Krause *et al.*, 2010 ; Dumont *et al.*, 2011). De plus, bien que les méthanotrophes de Type II soient fortement représentés, il est possible qu'ils ne participent que faiblement à l'oxydation du méthane. En effet, des études menées dans différents écosystèmes (dont le Lac Pavin) décrivent qu'une forte proportion de méthanotrophes de Type II (ADN, *pmoA*) peut être associée à une faible activité (PFLA, ARN) (Shrestha *et al.*, 2008 ; Krause *et al.*, 2010 ; Biderre-Petit *et al.*, 2011). L'adaptabilité des méthanotrophes de Type I aux changements environnementaux (stratège r) et l'abondance relative des T-RF affiliés à *Methylobacter* dans notre étude, laissent penser que ce genre pourrait être responsable d'une part relativement importante de l'oxydation du méthane dans les sédiments du Lac du Bourget.

Logiquement l'abondance maximale des méthanotrophes a été observée dans la strate d'interface (0-1 cm), en lien avec leur activité de méthanotrophie aérobie, s'opérant dans les premiers centimètres des sédiments lacustres (Borrel *et al.*, 2011). Rahalkar *et al.* (2009) ont observé, dans le Lac de Constance, que l'abondance des méthanotrophes était maximale juste en dessous de l'interface, autour de 2-3 cm de profondeur, où les conditions sont anaérobies mais la concentration en méthane plus importante. Dans notre étude, la capacité des méthanotrophes à survivre en conditions non oxygénées (Roslev & King, 1996, Rahalkar *et al.*, 2007) leur permet de pouvoir reprendre une activité de méthanotrophie après une

perturbation (diminution ou une absence d'oxygène ponctuelle dans le milieu), a été détectée lors de l'augmentation de leur abondance dans le premier centimètre de la station la plus profonde au moment du brassage hivernal.

4. Co-variations de la structure et de l'abondance des méthanogènes et des méthanotrophes

Les 2 communautés fonctionnelles étudiées montrent une co-structuration pour l'ensemble des stations qui est plus forte en période hivernale comparativement aux périodes où l'interface eau-sédiment est oxygénée. Ceci est cohérent avec les changements de structure observés dans les sédiments du Lac du Bourget, puisque les méthanotrophes ont une dynamique temporelle liée à des changements d'oxygénation à l'interface eau-sédiment.

Pour les méthanogènes, on observe une augmentation de l'abondance sur l'ensemble des stations durant la période hivernale (baisse de l'oxygénation à l'interface eau-sédiment) ce qui suggère qu'ils pourraient être actifs et produire du méthane durant cette période (une mesure d'activité étant indispensable pour vérifier cette hypothèse). Or, on observe sur les stations 1 et 2 que l'abondance des méthanotrophes dans la strate d'interface (0-1 cm) augmente durant la période hivernale alors qu'en parallèle la saturation en oxygène à l'interface eau-sédiment diminue. Ceci pourrait être expliqué par l'augmentation de la concentration en méthane dans les sédiments qui favoriserait la méthanotrophie malgré une baisse de la saturation en oxygène. Les méthanotrophes de Type II préféreraient des environnements riches en méthane et faibles en oxygène (Semrau *et al.*, 2010 ; Chowdhury & Dick, 2013), notamment en cas de compétitions avec d'autres méthanotrophes. Ceci est en accord avec les variations de structure observées pour cette communauté. En effet, l'abondance relative des T-RF correspondant aux méthanotrophes de Type II est importante à cette même période et diminue par la suite. On note que malgré l'augmentation de l'abondance des méthanogènes durant la période hivernale, l'abondance des méthanotrophes n'augmente pas sur la station 3, probablement du à l'absence d'oxygénation de cette station.

V. Conclusion

Cette étude a montré des modifications de la structure et de l'abondance des méthanotrophes en lien avec la dynamique saisonnière lacustre et des variations ponctuelles pour les méthanogènes. La strate d'interface (0-1 cm) est la seule affectée dans le cas des méthanogènes alors que les méthanotrophes sont impactés jusqu'à la strate 4-5 cm. Pour les méthanogènes la nature du substrat semble être le paramètre le plus structurant mais cela demande une étude complémentaire prenant en compte la qualité de la matière organique en plus de sa quantité. Pour les méthanotrophes, la disponibilité de l'oxygène est un paramètre influençant à la fois la structure et l'abondance de cette communauté. Pour affiner cette étude, la structure et l'abondance des communautés méthanogènes et méthanotrophes devront être analysées plus finement (centimètre par centimètre) sur les 5 premiers centimètres des sédiments du Lac du Bourget afin de mieux cibler les changements, en lien avec la dynamique saisonnière lacustre, dans la verticalité. Quant à l'analyse sur la variabilité temporelle, elle devra être affinée avec un pas de temps plus court, pour mieux évaluer les changements des communautés méthanogènes et méthanotrophes en lien avec la dynamique planctonique saisonnière lacustre. Enfin, pour valider certaines hypothèses émises suite à cette étude, quant à l'activité de certains ordres méthanogènes et méthanotrophes, une mesure de l'activité devra être envisagée.

Chapitre V

—

Discussion et perspectives

I. Limites méthodologiques à l'étude des communautés microbiennes benthiques

De nombreuses études se sont intéressées à l'analyse de la variabilité spatiale des communautés bactériennes et archéennes en utilisant des techniques de génotypage, mettant en avant différents patrons de variabilité (Bertic & Ziebis, 2009 ; Hewson *et al.*, 2007 ; Sapp *et al.*, 2010 ; Tsertova *et al.*, 2013). Pour l'étude de la structure des communautés microbiennes totales dans les sédiments du Lac du Bourget, le choix du génotypage a été conditionné par le nombre important de réplicats pour chaque communauté et la rapidité des techniques que sont l'ARISA et la T-RFLP. Elles sont couramment utilisées en écologie microbienne du fait de leur robustesse et de leur capacité à distinguer une large diversité microbienne (Ranjard *et al.*, 2000 ; Danovaro *et al.*, 2006 ; Fuhrman *et al.*, 2008 ; Luna *et al.*, 2009). Toutefois, de récentes études ont souligné leurs limites (sous estimation de la richesse, restriction parfois incomplète...) comparativement aux techniques de séquençage massif (NGS) (Gilbert *et al.*, 2009 ; Bienhold *et al.*, 2012 ; Jacob *et al.*, 2013). L'ARISA permet l'étude de taxons bactériens dominants mais elle offre cependant une faible résolution pour la détection des espèces rares, en comparaison des techniques de séquençage massif. (Gobet *et al.*, 2014 ; Jacob *et al.*, 2013)

Dans notre cas, l'utilisation de techniques de séquençage massif pour l'étude de la dynamique des communautés méthanogènes et méthanotrophes benthiques n'apporterait que peu d'informations supplémentaires. En revanche, cela pourrait potentiellement être intéressant pour l'étude de la variabilité spatiale des communautés totales (bactéries et archées). En effet, l'utilisation de techniques ayant une résolution plus importante (NGS) pourrait permettre d'appréhender des changements dans la structure des communautés totales notamment en intra-station (en particulier la station soumise aux apports de matières organiques allochtones), de part la détection de taxa rares, pour le moment faiblement pris en compte. Les membres de la biosphère rare sont potentiellement importants dans les écosystèmes et leur étude revêt un caractère important dans l'étude de la dynamique des communautés microbiennes totales et dans la compréhension du fonctionnement de l'écosystème (Peter *et al.*, 2011 ; Jones & Lennon, 2010 ; Campbell *et al.*, 2011).

II. Facteurs de contrôle de la distribution des communautés méthanogènes et méthanotrophes dans les sédiments lacustres

Nos travaux ont permis d'identifier certains paramètres environnementaux impliqués dans la dynamique des méthanogènes et des méthanotrophes benthiques dans le Lac du Bourget. Nos observations démontrent l'importance de certains paramètres clés, déjà identifiés dans d'autres études, comme la disponibilité en oxygène (Semrau *et al.*, 2010) et les apports nutritifs (Schwarz *et al.*, 2008) dans les variations spatio-temporelles de la structure et de l'abondances de ces communautés. Ainsi, la saturation en oxygène à l'interface eau-sédiment est le seul facteur identifié qui est impliqué dans l'ensemble des modifications spatio-temporelles d'abondance et de la dynamique des communautés microbiennes impliquées dans le cycle du méthane.

1. Cas des méthanotrophes

Les méthanotrophes ont besoin d'oxygène afin de réaliser la méthanotrophie, ce paramètre régit donc la dynamique des méthanotrophes, c'est pourquoi la plupart des études sur cette communauté sont réalisées dans les premiers centimètres des sédiments (Auman *et al.*, 2000 ; Bussman *et al.*, 2004 ; Deutzman *et al.*, 2011). Rahalkar *et al.* (2009) ont rapporté une abondance maximale des méthanotrophes dans les premières strates non oxygénées (2-3 cm) des sédiments du Lac de Constance. Dans les sédiments du Lac du Bourget, les méthanotrophes sont détectés dans les strates non oxygénées (4-5 cm) voire anoxiques (au delà de 10 cm de profondeur). Or, sans oxygène (O₂) disponible les méthanotrophes seuls ne peuvent réaliser la méthanotrophie : soit ils ne sont pas actifs en dehors de la limite de diffusion de l'oxygène, soit ils sont couplés avec des organismes intervenant dans d'autres cycles biogéochimiques leur fournissant l'oxygène dont ils ont besoin pour réaliser la méthanotrophie. Dans le cas où les méthanotrophes ne seraient pas actifs, c'est à dire qu'ils ne réaliseraient pas la méthanotrophie, ils pourraient être présents sous une forme de dormance. Les méthanotrophes ont été décrits comme pouvant former des exospores (Whittenbury *et al.*, 1970 ; Bowman *et al.*, 1993) leur permettant de survivre de nombreuses années dans des conditions défavorables (Rothfuss *et al.*, 1997). Ceci peut être une explication à l'abondance observée des méthanotrophes dans les strates anoxiques. Dans le cas où les méthanotrophes seraient actifs, il leur faudrait donc nécessairement trouver de l'oxygène pour réaliser la

méthanotrophie. L'une des possibilités, déjà observée dans la littérature, est le couplage des méthanotrophes avec d'autres organismes, les cas les plus couramment décrits sont les méthanotrophes anaérobies (ANME). Toutefois, ces organismes sont, à l'heure actuelle, uniquement des archées, par conséquent nous ne pouvons pas les détecter parmi les bactéries méthanotrophes. L'autre possibilité est la présence du phylum bactérien NC10 dans les sédiments du Lac du Bourget. Les bactéries appartenant au phylum NC10 ont besoin de nitrite pour pouvoir en retirer l'oxygène, *via* la voie de la dénitrification, et réaliser la méthanotrophie. Ces organismes sont pourvus du gène *pmo* (Ettwig *et al.*, 2010) et ont été détectés dans les sédiments lacustres (Deutzman & Schink, 2011). Les bactéries NC10 ayant besoin de nitrite (NO_2^-) pour en tirer l'oxygène, elles sont donc présentes dans les zones suboxiques des sédiments, par conséquent ces bactéries ne devraient pas se trouver très profond dans la verticalité des sédiments. Dans les sédiments du Lac du Bourget, les bactéries méthanotrophes détectées au-delà des 5 premiers centimètres sont donc probablement inactives et présentes sous forme de dormance.

En revanche, dans les zones du Lac où l'interface eau-sédiment est constamment oxygénée au cours de l'année, la présence d'organismes bioturbateurs modifie le gradient de diffusion de l'oxygène (Jones & Grey, 2011). Ainsi, l'oxygène (O_2) est présent à des profondeurs plus importantes dans la verticalité des sédiments. Les méthanotrophes étant plus compétitifs par rapport aux bactéries hydrolytiques lorsque les conditions en oxygène sont limitantes, car ils ont une forte affinité pour l'oxygène (van Bodegom *et al.*, 2001), il est donc possible que cette communauté se situe encore plus en profondeur dans la verticalité des sédiments afin de limiter la compétition pour l'oxygène. En conséquence dans les zones littorales, où la concurrence pour l'oxygène est plus importante, les méthanotrophes sont possiblement actifs au delà des 5 premiers centimètres des sédiments.

2. Cas des méthanogènes

L'augmentation de l'abondance des méthanogènes durant la période d'anoxie, sur la station la plus profonde, confirme que l'absence d'oxygène est une condition préférentielle pour cette communauté. Toutefois, leur présence est détectée dans la strate d'interface des stations les plus oxygénées. La présence de *Methanosarcina* dans la strate d'interface eau-sédiment, lorsque celle-ci est oxygénée, est intéressante notamment au vu des travaux de Angel *et al.* (2011), démontrant que ce genre est capable de supporter des conditions

oxygénées. Mais *Methanosarcina* n'est pas le seul genre à posséder les gènes de la catalase et de la peroxydase permettant de s'adapter aux conditions oxiques, *Methanocella* sp. (Erkel *et al.*, 2006), *Methanosphaerula palustris* (Cadillo-Quiroz *et al.*, 2008) ou encore *Methanoregula boonei* (Bräuer *et al.*, 2006) sont également porteurs de ces gènes. Cette adaptation à l'oxygène s'avère plus répandue que ce que l'on pensait chez les méthanogènes. Ainsi, certains méthanogènes sont capables de transcrire les gènes de la catalase et de la peroxydase en conditions oxygénées pour réaliser la méthanogénèse en milieux lacustres (Grossart *et al.*, 2011 ; Tang *et al.*, 2014 ; Bogard *et al.*, 2014). Les études citées précédemment font le lien entre cette production de méthane en conditions oxiques et les apports de matières organiques issue de la production phytoplanctonique confirmant des études précédentes ayant émis l'hypothèse que la méthanogénèse en milieu oxique était principalement acétoclastique (Murase *et al.*, 2003 ; Bastviken *et al.*, 2008). De plus, la sédimentation de la biomasse phytoplanctonique va favoriser les processus benthiques de dégradation de la matière organique par les bactéries hydrolytiques et acetogènes. Ceci va avoir pour effet d'augmenter la concentration en acétate dans les sédiments (Schulz & Conrad, 1995). Par conséquent, la structure et l'abondance des méthanogènes vont être influencés par ces changements et l'ordre des *Methanosarcinales* (acétotrophes) sera favorisé. En outre, ces processus de dégradation peuvent s'effectuer au delà de l'interface eau-sédiment. Il n'est donc pas exclu que les changements, en lien avec la dynamique saisonnière lacustre décrite précédemment, puissent affecter la structure et l'abondance des méthanogènes plus en profondeur dans la verticalité des sédiments.

Une dernière hypothèse permettant d'expliquer la présence de méthanogènes dans les strates oxygénées est que ceux-ci pourraient former des associations syntrophiques avec des bactéries fermentatives (Stams & Plugge, 2009). Ces agrégats créent des conditions anoxiques favorables aux méthanogènes qui peuvent alors utiliser le dihydrogène produit par les bactéries fermentatives ce qui permet la croissance de ces dernières (Garcia *et al.*, 2000).

III. Diversité des communautés méthanogènes et méthanotrophes dans les sédiments lacustres

Nos résultats quant à la diversité des méthanogènes et des méthanotrophes reflètent ceux obtenus dans la majorité des écosystèmes lacustres tempérés étudiés actuellement

(Costello & Lidstrom, 1999 ; Biderre-Petit *et al.*, 2011 ; Deutzman *et al.*, 2011). La diversité des méthanogènes obtenue est marquée par une très forte dominance de clones appartenant aux *Methanomicrobiales* (88%) comparativement à la littérature (42 - 43% , Borrel *et al.*, 2011 ; Chaudhary *et al.*, 2013). Ceci peut être expliqué par un éventuel biais méthodologique, favorisant ce groupe. Tout d'abord, le choix de prendre des échantillons permettant de recouvrir l'ensemble des T-RF identifiés en génotypage est une première hypothèse. Ceci a induit une redondance de certains T-RF et notamment ceux, très abondants, appartenant aux *Methanomicrobiales*. Une seconde hypothèse permettant d'expliquer la sur-abondance des *Methanomicrobiales* est le choix des amorces. Banning *et al.*, 2005, démontrent que pour un même échantillon sédimentaire, la structure des méthanogènes observées diffère en fonction des amorces utilisées, allant de 70% de *Methanomicrobiales* (amorces ADNr 16S spécifiques des méthanogènes) jusqu'à 88% (amorces Luton *et al.*, 2002).

L'identification du T-RF 40 reste encore en suspend, car celui-ci regroupe plusieurs ordres de méthanogènes. Ce T-RF a une forte abondance dans les sédiments du Lac du Bourget, or nous n'avons pas pu savoir si cela était dû à grand nombre d'espèces ayant le même T-RF (avec une faible abondance chacune) ou si un genre, voire une espèce, était dominant. Les clones digérés *in silico* et ayant été affiliés à ce T-RF sont majoritairement des *Methanoregulaceae* mais *Methanosarcina* a aussi été identifié. Toutefois, au vu des analyses de structure et de diversité, bien que quelques biais aient pu être identifiés, le méthane produit dans les sédiments du Lac du Bourget semble être majoritairement issu d'une méthanogénèse hydrogénotrophe, par le genre *Methanoregula* principalement et qui pourrait ponctuellement être substitué par une méthanogénèse acétoclastique, particulièrement par le genre *Methanosarcina*, lors de la sédimentation des blooms algaux au printemps et à la fin de l'été.

La diversité des méthanotrophes est dominée par 2 genres *Methylobacter* et *Methylococcus*. Le premier est très souvent retrouvé dans les écosystèmes lacustres (Borrel *et al.*, 2011) et pourrait être un acteur de premier plan dans l'oxydation du méthane (Krause *et al.*, 2010 ; Biderre-Petit *et al.*, 2011). Quant au second, il a été observé quelques fois dans les sédiments lacustres (Costello & Lidstrom, 1999 ; Deutzman *et al.*, 2011 ; Dumont *et al.*, 2013) mais est plutôt décrit dans les écosystèmes de riziculture (Shrestha *et al.*, 2008 et 2010 ; Krause *et al.*, 2010 ; Ma & Lu, 2011 ; Ma *et al.*, 2013). Toutefois, Deutzman *et al.* (2011) dans les sédiments du Lac de Constance, ont observé des résultats comparables aux

nôtres, avec une abondance de *Methylococcus* forte en zone littorale et diminuant en zone profonde. Contrairement à l'interface eau-sédiment des zones pélagiques dans les lacs profonds, les zones littorales de ceux-ci ont des variations de température plus importantes mais surtout des températures plus élevées. Il est possible que *Methylococcus*, thermo-tolérant (Bowman, 2014), ait un avantage dans les sédiments lacustres plus chauds (zone littorale dans les lacs tempérés). Quant à *Methylobacter* il est avantagé, à l'inverse de *Methylococcus*, par des conditions environnementales plus froides (psychrophile/mésophile, Borrel *et al.*, 2011 ; Bowman, 2014) que l'on trouve en zones profondes. D'après des études sur les sédiments de rizières (Shrestha *et al.*, 2008 ; Krause *et al.*, 2010), les méthanotrophes de Type II ne sont pas très actifs dans l'oxydation du méthane, hormis lorsque les conditions en nutriments et en oxygène deviennent limitantes (Krause *et al.*, 2010). Par conséquent, il est possible que *Methylococcus* et *Methylobacter* soient les consommateurs de méthane dominants dans les sédiments du Lac du Bourget, le premier en zone littorale et côtière et le second en zone profonde.

IV. Perspectives d'études des communautés microbiennes benthiques impliquées dans le cycle du méthane

1. Etude de la variabilité spatio-temporelle

Tout d'abord il serait intéressant d'appréhender plus en détail la structure et l'abondance des méthanogènes et des méthanotrophes dans la verticalité des sédiments, afin de répondre à certains questionnements qui découlent de notre étude :

- A-t-on un changement progressif de la structure des communautés fonctionnelles étudiées qui se met en place dans les premiers centimètres (1 à 4 cm) se stabilisant par la suite entre 5 et 20 cm?
- L'abondance des méthanotrophes est-elle maximale à l'interface eau-sédiment ou juste au dessous de cette interface comme cela a pu être observé dans l'étude sur le Lac Constance (Rahalkar *et al.*, 2009)?

Pour répondre à ces questions, une étude à l'échelle centimétrique entre 0 et 5 cm de profondeur dans la verticalité serait nécessaire. De plus, il serait nécessaire de réaliser une

mesure du gradient d'oxydoréduction dans les 20 premiers centimètres analysés. Ce profil d'oxydoréduction permettrait de localiser les zones où se déroulent les différents processus biogéochimiques. Ainsi, il serait possible de cibler des strates spécifiques de production et d'oxydation du méthane, de même que des zones où peuvent avoir lieu des couplages entre le cycle du méthane et d'autres cycles biogéochimiques (soufre et azote principalement).

Afin de compléter cette étude, d'autres stations d'échantillonnage devraient être analysées le long du transect de distance. En particulier, une station située plus proche de la zone littorale (une profondeur de quelques mètres) et qui serait soumise à des changements de température importants (entre 4°C en hiver et jusqu'à 25°C en été) que nous n'avons pas pris en compte dans nos travaux

Pour ce qui est de la variabilité temporelle, les changements d'oxygénation en lien avec la stratification lacustre sont un facteur influençant la structure et l'abondance des méthanotrophes et des méthanogènes. Toutefois, cette étude révèle que la structure des communautés, plus particulièrement les méthanogènes, est influencée par des changements d'apports qualitatifs de matière organique en lien avec la dynamique saisonnière planctonique. Pour vérifier ceci à l'échelle des communautés fonctionnelles benthiques une étude avec des pas de temps plus rapprochés est nécessaire, soit en ciblant des périodes pré- et post-blooms alguaux, soit en faisant un suivi au cours d'une année complète. De plus, des trappes à sédiments pourraient être posées à différentes profondeurs dans la colonne d'eau afin d'évaluer les apports de la colonne d'eau au sédiment. Si notre hypothèse d'une modification de structure et d'abondance des méthanogènes benthiques en lien avec les changements apports de matière organique planctonique est vérifiée, alors une analyse de l'activité des méthanogènes sera effectuée. Ceci permettra de savoir si d'éventuels changements de structure de la communauté, en lien avec des variations d'apports de matières organiques, affectent les fonctions réalisées par cette communauté ou si malgré le changement de structure les fonctions de la communauté sont maintenues.

2. Etude des communautés actives

Bien qu'une mesure de l'activité potentielle (ARN) des méthanogènes et des méthanotrophes, dans les mêmes strates que celles étudiées dans l'analyse temporelle, ait été envisagée pour cette étude, cela n'a pu être réalisé. Ainsi, des questions restent en suspens

suite à nos travaux et doivent être abordées par une analyse de l'activité potentielle de ces communautés fonctionnelles, notamment afin d'identifier :

- si les méthanogènes présents dans la strate d'interface en conditions oxygènes sont actifs
- si les méthanotrophes présents au-delà de la limite de diffusion de l'oxygène (soit après le premier centimètre) sont actifs

Pour les 2 communautés, des marqueurs moléculaires spécifiques de certains taxa pourraient être utilisés afin de savoir quels ordres méthanogènes (acétéotrophes *vs.* hydrogénotrophes) et méthanotrophes (Type I *vs.* Type II) sont potentiellement les plus actifs dans les sédiments du Lac du Bourget. De même, cette analyse pourra être réalisée en lien avec la dynamique temporelle des communautés méthanogènes et méthanotrophes. Un suivi à l'échelle temporelle du potentiel d'activité de ces communautés permettra une identification des changements d'activité en lien avec des variations de l'oxygénation à l'interface eau-sédiment (stratification *vs.* brassage) et d'apports de matière organiques au sédiment (sédimentation de pics phytoplanctoniques).

3. Oxydation anaérobie du méthane

Les processus d'oxydation anaérobie du méthane (AOM, cf synthèse bibliographique) sont encore très peu connus dans les écosystèmes lacustres. Bien que l'AOM soit relativement faible dans les écosystèmes lacustres (10^3 à 10^4 fois plus faible que dans les écosystèmes marins), elle n'en reste pas moins importante. Son existence dans les sédiments du Lac Constance (Deutzman & Schink, 2011) et la similarité de nos résultats, en ce qui concerne l'abondance et la structure des méthanotrophes, avec ceux de Deutzman *et al.*, 2011 dans ce même lac, nous permettent d'envisager qu'il soit possible que des processus similaires d'AOM soient réalisés dans les sédiments du Lac du Bourget. Deutzman & Schink, 2011 ont montré que l'AOM dans les sédiments du Lac Constance était principalement liée à un couplage avec la dénitrification, due au phylum NC10, notamment pour les sédiments prélevés en zone profonde (entre 80 et 120 m). Cette même étude montre que l'AOM couplée à la dénitrification est de l'ordre d'un log inférieur à la méthanotrophie aérobie. Ce processus pourrait donc participer activement à la limitation des émissions de méthane dans les

écosystèmes lacustres : il paraît donc important d'identifier les acteurs de la méthanotrophie anaérobie.

Pour cela, des approches moléculaires, ciblant les gènes fonctionnels permettront d'identifier la présence des méthanotrophes anaérobies : *pmoA* pour l'identification des NC10 et *mcrA* pour les ANME. Bien que Deutzman & Schink, 2011 aient montré que l'AOM couplée avec le cycle du soufre soit négligeable dans les sédiments du Lac Constance d'autres études ont montré la présence des ANME dans les sédiments lacustres il est donc important de ne pas les négliger (Stein *et al.*, 2001 ; Eller *et al.*, 2005 ; Raghoebarsing *et al.*, 2006 ; Jiang *et al.*, 2008 ; Crowe *et al.*, 2010 ; Schubert *et al.*, 2011). Si les gènes *pmoA* affiliés à la division NC10 et *mcrA* affiliés aux ANME sont détectés il faudra envisager de les quantifier afin d'évaluer leurs abondances respectives, d'identifier la diversité présente dans les sédiments et d'effectuer une quantification des transcrits. Il sera aussi intéressant d'identifier les zones dans lesquelles ces processus sont réalisés à la fois à l'échelle spatiale horizontale (littoral vs. pélagique) et verticale (inter-strate). Ceci permettant de compléter notre étude en identifiant les acteurs de la méthanotrophie anaérobie qui est une partie du cycle qui n'a pas encore été étudiée dans les sédiments du Lac du Bourget et pour laquelle la littérature actuelle est encore assez pauvre sur cet écosystème.

Conclusion

Générale

Les écosystèmes lacustres contribuent de manière significative aux émissions globales de méthane dans l'atmosphère. De fait, l'étude des communautés microbiennes impliquées dans le cycle du méthane en milieu lacustre revêt un caractère important. Les sédiments lacustres offrent des conditions propices aux développements des communautés méthanogènes et méthanotrophes bien qu'ils aient des préférences écologiques contrastées. Les sédiments représentent un compartiment clef pour l'étude de ces communautés du fait de l'importante hétérogénéité des conditions environnementales présente, tant à l'échelle spatiale horizontale (entre différentes zones du lac, littoral *vs.* pelagique) et verticale (dans la profondeur des sédiments) qu'à l'échelle temporelle, en lien avec la dynamique saisonnière lacustre (biologique et thermique). Ainsi le compartiment benthique permet d'appréhender la distribution des communautés méthanogènes et méthanotrophes en lien avec les facteurs environnementaux qui influencent leurs structures, abondances et activités.

Les travaux effectués au cours de cette thèse apportent des informations supplémentaires quant à la distribution spatio-temporelle des communautés microbiennes benthiques impliquées dans le cycle du méthane en milieux lacustres. Afin d'appréhender au mieux les variations de la distribution de ces communautés à l'échelle spatiale dans les sédiments du Lac du Bourget, un transect de distance entre le principal affluent du Lac et la zone la plus profonde a été étudié. Sur ce transect des stations d'échantillonnages caractéristiques de différences d'apports de matières organiques (allochtones *vs.* autochtones) et ayant des conditions d'oxygénations différentes à l'interface eau-sédiment ont été pris en compte. Ceci a permis de montrer une variabilité spatiale horizontale (inter-stations) de la structure des communautés étudiées en lien avec des changements de conditions environnementales. Au sein de chacune des stations étudiées, l'échelle verticale a également été prise en compte, permettant de mettre en avant des modifications de structure des méthanotrophes et des méthanogènes en lien avec avec d'éventuelles modifications du gradient d'oxydoréduction dans la verticalité des sédiments.

Dans un second temps, ces travaux ont appréhendé les éventuels changements de structure et d'abondance des communautés méthanogènes et méthanotrophes, en lien avec la dynamique saisonnière lacustre (biologique et thermique). Ainsi il a été mis en avant que seuls les méthanotrophes répondent à la dynamique saisonnière dans les sédiments du Lac du Bourget par des changements de structure sur l'ensemble des stations étudiées et jusqu'à 5 cm de

profondeur dans la verticalité. La dynamique des méthanogènes est relativement stable et ne montre que des variations ponctuelles à l'interface eau-sédiment. Si la dynamique des méthanotrophes répond fortement aux changements d'oxygénation à l'interface eau-sédiment, celle des méthanogènes semble plutôt sous l'influence de changement de la qualité de la matière organique. Toutefois, ceci demande confirmation par des études complémentaires, à la fois à l'échelle spatiale horizontale en ajoutant une station littorale soumise à des variations de température au cours de l'année, à l'échelle spatiale verticale en affinant l'étude des 5 premiers centimètre et à l'échelle temporelle en ciblant des périodes en lien avec la dynamique planctonique lacustre (modification des apports de matières organiques aux sédiments). Enfin, il est maintenant nécessaire de réaliser une étude caractérisant les zones et les périodes de production et d'oxydation du méthane dans les sédiments du Lac du Bourget. Par la suite, une analyse plus précise de la diversité pourra être envisagée afin de caractériser plus précisément les acteurs du cycle du méthane dans les sédiments lacustres.

Finalement, la caractérisation de la distribution spatio-temporelle de la dynamique des communautés méthanogènes et méthanotrophes apparaît comme une étape préliminaire mais indispensable dans la compréhension des flux que contrôlent ces communautés. Elle permet la discrimination de zones benthiques importantes en termes de production et d'oxydation du méthane au sein d'un écosystème complexe. C'est dans ce sens que les futures études doivent se positionner afin d'aller plus loin dans la compréhension de la distribution des méthanogènes et des méthanotrophes benthiques.

Références Bibliographiques

A

Akiyama M., S. Shimizu, T. Sakai, S. Ioka, Y. Ishijima, T. Naganuma, 2011. Spatiotemporal variations in the abundances of the prokaryotic rRNA genes, *pmoA*, and *mcrA* in the deep layers of a peat bog in Sarobetsu-genya wetland, Japan. *Limnology* 12: 1–9.

Alvarado A., L.E. Montañez-Hernández, S.L. Palacio-Molina, R. Oropeza-Navarro, M.P. Luévanos-Escareño & N. Balagurusamy, 2014. Microbial trophic interactions and *mcrA* gene expression in monitoring of anaerobic digesters. *Front. Microbiol.* 5: 1-14.

Amaral J.A. & R. Knowles, 1995. Growth of methanotrophs in methane and oxygen counter gradients. *FEMS Microbiol. Lett.* 126: 215-220.

Angel R., D. Matthies & R. Conrad, 2011. Activation of methanogenesis in arid biological soil crusts despite the presence of oxygen. *Plos One* 6: e20453.

Antony C.P., J.C. Murrell & Y.S. Shouche, 2012. Molecular diversity of methanogens and identification of *Methanlobus* sp. as active methylotrophic Archaea in Lonar crater lake sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 81: 43–51.

Arnaud F., 2005. Discriminating bio-induced and detrital sedimentary processes from particle size distribution of carbonates and non-carbonates in hard water lake sediments. *J. Paleolimnol.* 34: 519–526.

Auguet J.C., A. Barberan & E.O. Casamayor, 2010. Global ecological patterns in uncultured Archaea. *ISME J.* 4: 182-190.

Auguet J.C., N. Nomokonova, L. Camarero & E.O. Casamayor, 2011. Seasonal changes of freshwater ammonia-oxidizing archaeal assemblages and nitrogen species in oligotrophic alpine lakes. *Appl. Environ. Microb.* 77: 1937-1945.

Auman A.J., S. Stolyar, A.M. Costello & M.E. Lidstrom, 2000. Molecular characterization of methanotrophic isolates from freshwater lake sediment. *Appl. Environ. Microb.* 66: 5259-5266.

Avnimelech Y., G. Ritvo, L.E. Meijer & M. Kochba, 2001. Water content, organic carbon, and dry bulk density in flooded sediments. *Aquacult. Eng.* 25: 25–33.

B

Balvay G., J-C. Druart & S. Jacquet, 2012. Le lac du Bourget, ses eaux et sa biologie. Quae (eds.), p. 184.

Barbier B.A., I. Dziduch, S. Liebner, L. Ganzert, H. Lantuit, W. Pollard & D. Wagner, 2012. Methane-cycling communities in a permafrost-affected soil on Herschel Island, Western Canadian Arctic: active layer profiling of *mcrA* and *pmoA* genes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 82: 287-302.

Barnes R.O. & E.D. Goldberg, 1976. Methane production and consumption in anoxic marine-sediments. *Geology* 4: 297-300.

Bastviken D., J.J. Cole, M. Pace & L. Tranvik, 2004. Methane emissions from lakes: Dependence of lake characteristics, two regional assessments, and a global estimate. *Global Biogeochem. Cy.* 18: GB4009.

Bastviken D., J.J. Cole, M.L. Pace & M.C. Van de Bogert, 2008. Fates of methane from different lake habitats: Connecting

- whole-lake budgets and CH₄ emissions. *J. Geophys. Res.* 113: G02024.
- Bastviken D.**, L.J. Tranvik, J.A. Downing, P.M. Crill & A. Enrich-Prast, 2011. Freshwater methane emissions offset the continental carbon sink. *Science* 331: 50.
- Beal E.J.**, C.H. House & V.J. Orphan, 2009. Manganese- and Iron-Dependent Marine Methane Oxidation. *Science* 325: 184-187.
- Bedard C. & R. Knowles**, 1989. Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of CH₄, NH₄⁺, and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. *Microbiol. Rev.* 53: 68-84.
- Belle S.**, C. Parent, V. Frossard, V. Verneaux, L. Millet, P-M. Chronopoulou, P. Sabatier & M. Magny, 2014. Temporal changes in the contribution of methane-oxidizing bacteria to the biomass of chironomid larvae determined using stable carbon isotopes and ancient DNA. *J. Paleolimnol.* 52: 215-228.
- Bertics V.J. & W. Ziebis**, 2009. Biodiversity of benthic microbial communities in bioturbated coastal sediments is controlled by geochemical microniches. *ISME J.* 3: 1269-1285.
- Bhattarai S.**, K.A. Ross, M. Schmid, F.S. Anselmetti & H. Bürgmann, 2012. Local conditions structure unique Archaeal communities in the anoxic sediments of meromictic Lake Kivu. *Microbiol. Ecol.* 64: 291-310.
- Biderre-Petit C.**, D. Jézéquel, E. Dugat-Bony, F. Lopes, J. Kuever, G. Borrel, E. Viollier, G. Fonty & P. Peyret, 2011. Identification of microbial communities involved in the methane cycle of a freshwater meromictic lake. *FEMS Microbiol. Ecol.* 77: 533-545.
- Bienhold C.**, A. Boetius & A. Ramette, 2012. The energy-diversity relationship of complex bacterial communities in Arctic deep-sea sediments. *ISME J.* 6: 724-732.
- Billard E.**, I. Domaizon, N. Tissot, F. Arnaud & E. Lyautey, 2015. Multi-scale phylogenetic heterogeneity of archaea, bacteria, methanogens and methanotrophs in lake sediments. *Hydrobiologia* 751: 159-173.
- Bodelier P.L.E. & H.J. Laanbroek**, 2004. Nitrogen as a regulatory factor of methane oxidation in soils and sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 47: 265-277.
- Bodelier P.L.**, M.J.B. Gillisen, K. Hordijk, J.S.S. Damsté, W.I.C. Rijpstra, J.A. Geenevasen & P.F. Dunfield, 2009. A reanalysis of phospholipid fatty acids as ecological biomarkers for methanotrophic bacteria. *ISME J.* 3: 606-617.
- Bodrossy L.**, N. Stralis-Pavese, J.C. Murrell, S. Radajewski, A. Weiharter & A. Sessitsch, 2003. Development and validation of a diagnostic microbial microarray for methanotrophs. *Environ. Microbiol.* 5: 566-582.
- Boetius A.**, K. Ravensschlag, C.J. Schubert, D. Rickert, F. Widdel, A. Gieseke, R. Amann, B.B. Jorgensen, U. Witte & O. Pfannkuche, 2000. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* 407: 623-626.
- Bogard M.J.**, P.A. del Giorgio, L. Boutet, M.C. Garcia-Chaves, Y.T. Prairie, A. Merante & A.M. Derry, 2014. Oxidic water column methanogenesis as a major component of aquatic CH₄ fluxes. *Nat. Commun.* 5: 5350.
- Bonin A.S. & D. Boone**, 2006. The Order *Methanobacteriales*. In The prokaryotes. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E., Bonin A.,

and Boone D. (eds): Springer New York, pp. 231-243.

Borrel G., D. Jézéquel, C. Biderre-Petit, N. Morel-Desrosiers, J-P. Morel, P. Peyret, G. Fonty, A-C. Lehours, 2011. Production and consumption of methane in freshwater lake ecosystems. *Res. Microbiol.* 162: 832-847.

Borrel G., A-C. Lehours, O. Crouzet, D. Jézéquel, K. Rockne, A. Kulczak, E. Duffaud, K. Joblin & G. Fonty, 2012. Stratification of Archaea in the deep sediments of a freshwater meromictic lake: vertical shift from methanogenic to uncultured Archaeal lineages. *PLOS One* 7: e43346.

Bosse U., P. Frenzel & R. Conrad, 1993. Inhibition of methane oxidation by ammonium in the surface layer of a littoral sediment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 13: 123-134.

Bourne D.G., I.R. McDonald & J.C. Murrell, 2001. Comparison of *pmoA* PCR primer sets as tools for investigating methanotroph diversity in three Danish soils. *Appl. Environ. Microb.* 67: 3802-3809.

Bowen J.L., H.G. Morrison, J.E. Hobbie & M.L. Sogin, 2012. Salt marsh sediment diversity: a test of the variability of the rare biosphere among environmental replicates. *ISME J.* 6: 2014-2023.

Bowman J.P., L.I. Sly, P.D. Nichols & A.C. Hayward, 1993. Revised taxonomy of the methanotrophs: description of *Methylobacter* gen. nov., emendation of *Methylococcus*, validation of *Methylosinus* and *Methylocystis* species, and a proposal that the family *Methylococcaceae* includes only the group I methanotrophs. *International J. Syst. Bacteriol.* 43: 735-753.

Bowman J.P., 2014. The Family *Methylococcaceae*. In *The prokaryotes*. E. Rosenberg, E.F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, F. Thompson (eds): Springer New York, pp. 411-440.

Brandl H., K.W. Hanselmann & R. Bachoffen, 1990. In situ stimulation of bacterial sulfate reduction in sulfate-limited freshwater sediments. *FEMS Microbiol. Lett.* 74: 21-32.

Brandl H., K.W. Hanselmann, R. Bachoffen & J. Picard, 1993. Small-scale patchiness in the chemistry and microbiology of sediments in Lake Geneva, Switzerland. *J. Gen. Microbiol.* 139: 2271-2275.

Bräuer S., H. Cadillo-Quiroz, E. Yashiro, J.B. Yavitt & S.H. Zinder, 2006. Isolation of a novel acidiphilic methanogen from an acidic peat bog. *Nature* 442: 192-194.

Bussmann I., M. Pester, A. Brune & B. Schink, 2004. Preferential cultivation of type II methanotrophic bacteria from littoral sediments (Lake Constance). *FEMS Microbiol. Ecol.* 47: 179-189.

Bussmann I., E. Damm, M. Schlüter & M. Wessels, 2013. Fate of methane bubbles released by pockmarks in Lake Constance. *Biogeochemistry* 112: 613-623.

C

Cadillo-Quiroz H., S. Brauer, E. Yashiro, C. Sun, J. Yavitt & S. Zinder, 2006. Vertical profiles of methanogenesis and methanogens in two contrasting acidic peatlands in central New York State, USA. *Environ. Microbiol.* 8: 1428-1440.

Cadillo-Quiroz H., E. Yashiro, J.B. Yavitt & S.H. Zinder, 2008. Characterization of the archaeal community in a minerotrophic fen and terminal restriction fragment length polymorphism-directed isolation of

a novel hydrogenotrophic methanogen. *Appl. Environ. Microb.* 74: 2059-2068.

Campbell B.J., L. Yu, J.F. Heidelberg & D.L. Kirchman, 2011. Activity of abundant and rare bacteria in a coastal ocean. *PNAS* 108: 12776-12781.

Canning-Clode J., N. Valdivia, M. Molis, J.C. Thomason & M. Wahl, 2008. Estimation of regional richness in marine benthic communities: quantifying the error. *Limnol. Oceanogr.* 6: 580-590.

Cébron A., L. Bodrossy, Y. Chen, A.C. Singer, I.P. Thompson, J.I. Prosser & J.C. Murrell, 2007. Identity of active methanotrophs in landfill cover soil as revealed by DNA-stable isotope probing. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62: 12-23.

Chan O.C., M. Wolf, D. Hepperle & P. Casper, 2002. Methanogenic archaeal community in the sediment of an artificially partitioned acidic bog lake. *FEMS Microbiol. Ecol.* 42: 119-129.

Chan O.C., P. Claus, P. Casper, A. Ulrich, T. Lueders & R. Conrad, 2005. Vertical distribution of structure and function of the methanogenic archaeal community in Lake Dagow sediment. *Environ. Microbiol.* 7: 1139-1149.

Chapron E., F. Arnaud, H. Noël, M. Revel, M. Desmet & L. Perdereau, 2005. Rhone River flood deposits in Lake Le Bourget: a proxy for Holocene environmental changes in the NW Alps, France. *Boreas* 34: 404-416.

Chaudhary P.P., L. Brablcová, I. Buriánková & M. Rulík, 2013. Molecular diversity and tools for deciphering the methanogen community structure and diversity in freshwater sediments. *Appl. Microbiol. Biot.* 97: 7553-7562.

Chen H., Q. Zhu, C. Peng, N. Wu, Y. Wang, X. Fang, H. Jiang, W. Xiang, J.I.E.

Chang, X. Deng & G. Yu, 2013. Methane emissions from rice paddies natural wetlands, lakes in China: synthesis new estimate. *Glob. Change Biol.* 19: 19-32.

Choi K.-H. & F.C. Dobbs, 1999. Comparison of two kinds of Biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities. *J. Microbiol. Meth.* 36: 203-213.

Chowdhury T.R. & R.P. Dick, 2013. Ecology of aerobic methanotrophs in controlling methane fluxes from wetlands. *Appl. Soil Ecol.* 65: 8-22.

Clarke K.R. & R.M. Warwick, 2001. Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation, 2nd edition. PRIMER-E, Plymouth.

Conrad R., 1996. Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO). *Microbiol. Rev.* 60: 609-640.

Conrad R., 1999. Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 28: 193-202.

Conrad R., 2007. Microbial ecology of methanogens and methanotrophs. *Adv. Agron.* 96: 1-63.

Conrad R., 2009. The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved. *Environ. Microbiol. Rep.* 1: 285-292.

Conrad R., M. Klose, P. Claus & A. Enrich-Prast, 2010. Methanogenic pathway, C-13 isotope fractionation, and archaeal community composition in the sediment of two clear-water lakes of Amazonia. *Limnol. Oceanogr.* 55: 689-702.

Costello A.M. & M.E. Lidstrom, 1999. Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments. *Appl. Environ. Microb.* 65: 5066-5074.

Costello A.M., A.J. Auman, J.L. Macalady, K.M. Scow & M.E. Lidstrom, 2002. Estimation of methanotroph abundance in a freshwater lake sediment. *Environ. Microbiol.* 4: 443-450.

Crowe S.A. et al., 2010. The methane cycle in ferruginous Lake Matano. *Geobiol.* 9: 61-78.

D

Daebeler A., M. Gansen & P. Frenzel, 2013. Methyl fluoride affects methanogenesis rather than community composition of methanogenic Archaea in a rice field soil. *PLOS One* 8: e53656.

Danovaro R., E. Manini & A. Dell'Anno, 2002. Higher abundance of bacteria than of viruses in deep mediterranean sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1468-1472.

Danovaro R., G.M. Luna, A. Dell'Anno & B. Pietrangeli, 2006. Comparison of two fingerprinting techniques, Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism and Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis, for determination of bacterial diversity in aquatic environments. *Appl. Environ. Microb.* 72: 5982-5989.

Degelmann D.M., W. Borken, H.L. Drake & S. Kolb, 2010. Different Atmospheric Methane-Oxidizing Communities in European Beech and Norway Spruce Soils. *Appl. Environ. Microb.* 76: 3228-3235.

Deines P., J. Grey, H.H. Richnow & G. Eller, 2007. Linking larval chironomids to methane: seasonal variation of the microbial methane cycle and chironomid

delta C-13. *Aquat. Microb. Ecol.* 46: 273-282.

Deutzmann J.S., S. Wörner & B. Schink, 2011. Activity and Diversity of Methanotrophic Bacteria at Methane Seeps in Eastern Lake Constance Sediments. *Appl. Environ. Microb.* 77: 2573-2581.

Deutzmann J. & B. Schink, 2011. Anaerobic oxidation of methane in sediments of Lake Constance, an oligotrophic freshwater lake. *Appl. Environ. Microb.* 77: 4429-4436.

Dhillon A., M. Lever, K.G. Lloyd, D.B. Albert, M.L. Sogin & A. Teske, 2005. Methanogen diversity evidenced by molecular characterization of methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) genes in hydrothermal sediments of the Guaymas Basin. *Appl. Environ. Microb.* 71: 4592-4601.

Docherty K.M., K.C. Young, P.A. Maurice & S.D. Bridgham, 2006. Dissolved organic matter concentration and quality influences upon structure and function of freshwater microbial communities. *Microbial. Ecol.* 52: 378-388.

Domaizon I., O. Savichtcheva, D. Debroas, F. Arnaud, C. Villar, C. Pignol, B. Alric & M.E. Perga, 2013. DNA from lake sediments reveals the long-term dynamics and diversity of *Synechococcus* assemblages. *Biogeosciences* 10: 3817-3838.

Downing J.A., Y.T. Prairie, J.J. Cole, C.M. Duarte, L.J. Tranvik, R.G. Striegl, W.H. McDowell, P. Kortelainen, N.F. Caraco, J.M. Melack & J.J. Middleburg, 2006. The global abundance and size distribution of lakes, ponds, and impoundments. *Limnol. Oceanogr.* 51: 2388-2397.

Dray S. & A.B. Dufour, 2007. The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *J. Stat. Softw.* 22: 1-20.

Duc N.T., P. Crill & D. Bastviken, 2010. Implications of temperature and sediment characteristics on methane formation and oxidation in lake sediments. *Biogeochemistry* 100: 185-196.

Duhamel S. & S. Jacquet, 2006. Flow cytometry analysis of bacteria- and virus-like particles in lake sediments. *J. Microbiol. Meth.* 64: 316-332.

Dumestre J.-F., E.O. Casamayor, R. Massana & C. Pedrós-Alió, 2002. Changes in bacterial and archaeal assemblages in an equatorial river induced by the water eutrophication of Petit Saut dam reservoir (French Guiana). *Aquat. Microb. Ecol.* 26: 209-221.

Dumont M.G., B. Pommerencke, P. Casper & R. Conrad, 2011. DNA-, rRNA- and mRNA-based stable isotope probing of aerobic methanotrophs in lake sediment. *Environ. Microbiol.* 13: 1153-1167.

Dumont M.G., B. Pommerencke & P. Casper, 2013. Using stable isotope probing to obtain a target metatranscriptome of aerobic methanotrophs in lake sediment. *Environ. Microbiol. Reports* 5: 757-764.

Dunbar J., L.O. Ticknor & C.R. Kuske, 2000. Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Appl. Environ. Microb.* 66: 2943-2950.

Dunfield O.F. et al., 2007. Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum *Verrucomicrobia*. *Nature* 450: 879-882.

E

Earl J., R.W. Pickup, D.A. Ritchie & C. Edwards, 2005. Development of temporal temperature gradient electrophoresis for characterising methanogen diversity. *Microbiol. Ecol.* 50: 327-336.

Edlund A., F. Hårdeman, J.K. Jansson & S. Sjöling, 2008. Active bacterial community structure along vertical redox gradients in Baltic Sea sediment. *Environ. Microbiol.* 10: 2051-2063.

Eller G., L.K. Kanel & M. Kruger, 2005. Cooccurrence of aerobic and anaerobic methane oxidation in the water column of lake Plußsee. *Appl. Environ. Microb.* 71: 8925-8928.

EPA 2010. Methane and nitrous oxide emissions from natural sources. United State Environmental Protection Agency. Washington, DC.

Erkel C., M. Kube, R. Reinhardt & W. Liesack, 2006. Genome of rice cluster I archaea – the key methane producers in the rice rhizosphere. *Science* 313: 1457-1462.

Ettwig K.F., S. Shima, K.T. van de Pas-Schoonen, J. Kahnt, M.H. Medema, H.J.M. op den Camp, M.S.M. Jetten & M. Strous, 2008. Denitrifying bacteria anaerobically oxidize methane in the absence of Archaea. *Environ. Microbiol.* 10: 3164-3173.

Ettwig K.F., T. van Alen, K.T. van de Pas-Schoonen, M.S.M. Jetten & M. Strous, 2009. Enrichment and molecular detection of denitrifying methanotrophic bacteria of the NC10 phylum. *Appl. Environ. Microb.* 75: 3656-3662.

Ettwig K.F. et al., 2010. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature* 464: 543-548.

F

Falz K.Z., C. Holliger, R. Grosskopf, W. Liesack, A.N. Nozhevnikova, B. Muller, B. Wehrli & D. Hahn, 1999. Vertical distribution of methanogens in the anoxic sediment of Rotsee (Switzerland). *Appl. Environ. Microb.* 65: 2402-2408.

Fenchel T. & B.J. Finlay, 1995. Ecology and evolution in anoxic worlds. Oxford University Press, Oxford (United Kingdom).

Fenchel T., G.M. King & T.H. Blackburn, 1998. Bacterial biochemistry: The ecophysiology of mineral cycling, 2nd edition. Academic Press, San Diego.

Fernandez J.E., F. Peeters & H. Hofmann, 2014. Importance of the Autumn Overturn and Anoxic Conditions in the hypolimnion for the annual methane emissions from a temperate lake. *Environ. Sci. Technol.* 48: 7297-7304.

Fish J.A., B. Chai, Q. Wang, Y. Sun, C.T. Brown, J.M. Tiedje & J.R. Cole, 2013. FunGene: the Functional Gene Pipeline and Repository. *Front. Microbiol.* 4: 291.

Freitag T.E., S. Toet, P. Ineson & J.I. Prosser, 2010. Links between methane flux and transcriptional activities of methanogens and methane oxidizers in a blanket peat bog. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73: 157-165.

Frey J.C., A.N. Pell, R. Berthiaume, H. Lapierre, S. Lee, J.K. Ha, J.E. Mendell & E.R. Angert, 2009. Comparative studies of microbial populations in the rumen, duodenum, ileum and faeces of lactating dairy cows. *J. Appl. Microbiol.* 108: 1982-1993.

Froelich P.N., G.P. Klinkhammer, M.L. Bender, N.A. Luedtke, G.R. Heath, D. Cullen, P. Dauphin, D. Hammond, B. Hartman & V. Maynard, 1979. Early oxidation of organic matter in pelagic sediments of the eastern equatorial

Atlantic: suboxic diagenesis. *Geochim. Cosmochim. Ac.* 43: 1075-1090.

Fuhrman J.A., J.A. Steele, I. Hewson, M.S. Schwalbach, M.V. Brown, J.L. Green & J.H. Brown, 2008. A latitudinal diversity gradient in planktonic marine bacteria. *PNAS* 105: 7774-7778.

G

Gantner S., A.F. Andersson, L.B. Alonso & Sáez, S., 2011. Novel primers for 16S rRNA-based archaeal community analyses in environmental samples. *J. Microbiol. Met.* 84: 12-18.

Garcia J.L., B.K.C. Patel & B. Ollivier, 2000. Taxonomic phylogenetic and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe* 6: 205-226.

Garrity G.M. & J.G. Holt, 2001. Phylum AII. *Euryarchaeota* phy. nov. In Boone, D.R., R.W. Castenholz & G.M. Garrity (eds) *Bergey's Manual*. 2nd edition. Springer-Verlag, New York, NY, USA, 211-355.

Garcia J-L., B. Ollivier & W. Whitman, 2006. The Order *Methanomicrobiales*. In *The prokaryotes*. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E., Garcia J.-L. *et al.* (eds): Springer New York, pp. 208-230.

Giguet-Covex C., 2010. Contribution des sédiments laminés lacustres à l'étude des changements environnementaux Holocène : approche couplée sédimentologique / géochimique à haute résolution : application à deux lacs nord-alpins. Université de Savoie, p.313

Giguet-Covex C., F. Arnaud, J. Poulenard, D. Enters, J-L. Reyss, L. Millet, J. Lazzaroto, O. Vidal, 2010. Sedimentological and geochemical records of past trophic state and hypolimnetic anoxia in large, hard-water Lake Bourget, French Alps. *J. Paleolimnol.* 43:171-190.

H

- Gihring T.** *et al.*, 2006. The distribution of microbial taxa in the subsurface water of the Kalahari Shield, South Africa. *Geomicrobiol. J.* 23: 415-430.
- Gilbert J.A.**, D. Field, P. Swift, L. Newbold, A. Oliver, T. Smyth, P.J. Somerfield, S. Huse & I. Joint, 2009. The seasonal structure of microbial communities in the Western English Channel. *Environ. Microbiol.* 11: 3132-3139.
- Glissmann K.**, K.J. Chin, P. Casper & R. Conrad, 2004. Methanogenic pathway and archaeal community structure in the sediment of eutrophic Lake Dagow: effect of temperature. *Microb. Ecol.* 48: 389-399.
- Go Y.S.**, S.K. Han, I.G. Lee & T.I. Ahn, 2000. Diversity of the domain Archaea as determined by 16S rRNA gene analysis in the sediments of Lake Soyang. *Arch. Hydrobiol.* 149: 459-466
- Gobet A.**, A. Boetius & A. Ramette, 2014. Ecological coherence of diversity patterns derived from classical fingerprinting and Next Generation Sequencing techniques. *Environ. Microbiol.* 16: 2672-3681.
- Goffredi S.K.**, R. Wilpiseski, R. Lee & V.J. Orphan, 2008. Temporal evolution of methane cycling and phylogenetic diversity of Archaea in sediments from a deep-sea whale-fall in Monterey Canyon, California. *ISME J.* 2: 204-220.
- Grossart H-P.**, K. Frindte, C. Dziallas, W. Eckert & K. W. Tang, 2011. Microbial methane production in oxygenated water column of an oligotrophic lake. *PNAS* 108: 19657-19661.
- Grover J.P. & T.H. Chrzanowski**, 2000. Seasonal patterns of substrate utilization by bacterioplankton: case studies in four temperate lakes of different latitudes. *Aquat. Microbiol. Ecol.* 23: 41-54.
- Hales B.A.**, C. Edwards, D.A. Ritchie, G. Hall, R.W. Pickup & J.R. Saunders, 1996. Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis. *Appl. Environ. Microb.* 62: 668-675.
- Hall T.A.**, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Hallam S.J.**, P.R. Girguis, C.M. Preston, P.M. Richardson & E.F. DeLong, 2003. Identification of methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) genes associated with methane-oxidizing archaea. *Appl. Environ. Microb.* 69: 5483-5491.
- Hallam S.J.**, N. Putnam, C.M. Preston, J.C. Detter, D. Rokhsar, P.M. Richardson & E.F. DeLong, 2004. Reverse methanogenesis: Testing the hypothesis with environmental genomics. *Science* 305: 1457-1462.
- Hammer O.**, D.A.T. Harper & P.D. Ryan, 2001. PAST – Palaeontological STatistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* 4: 9pp.
- Hanson R.S. & T.E. Hanson**, 1996. Methanotrophic bacteria. *Microbiol. Rev.* 60: 439-471.
- Haroon M.F.**, S. Hu, Y. Shi, M. Imelfort, J. Keller, P. Hugenholtz, Z. Yuan & G.W. Tyson, 2013. Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage. *Nature* 500: 567–570.
- He R.**, M.J. Wooler, J.W. Pohlman, J. Quensen, J.M. Tiedje & M.B. Leigh, 2012. Diversity of active aerobic methanotrophs along depth profiles of arctic and subarctic lake water column and sediments. *ISME J.* 6: 1937-1948.

Hedderich R. & W. Whitman, 2006. Physiology and biochemistry of the methane-producing archaea. In *Prokaryotes*. Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E., & Dworkin M. (eds), pp. 1050-1079.

Heino J., P. Louhi & T. Muotka, 2004. Identifying the scales of variability in stream macroinvertebrate abundance, functional composition and assemblage structure. *Freshwater Biol.* 49: 1230-1239.

Heiri O., A.F. Lotter & G. Lemcke, 2001. Loss on ignition as a method for estimating organic and carbonate content in sediments: reproducibility and comparability of results. *J. Paleolimnol.* 25: 101-110.

Hewson I., M.E. Jacobson Meyers & J.A. Fuhrman, 2007. Diversity and biogeography of bacterial assemblages in surface sediments across the San Pedro Basin, Southern California Borderlands. *Environ. Microbiol.* 9: 923-933.

Hinrichs K.U., J.M. Hayes, S.P. Sylva, P.G. Brewer & E.F. DeLong, 1999. Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments. *Nature* 398: 802-805.

Hirayama H., H. Fuse, M. Abe, M. Miyazaki, T. Nakamura, T. Nunoura, Y. Furushima, H. Yamamoto & K. Takai, 2013. *Methylomarinum vadi* gen. nov., sp. nov., a methanotroph isolated from two distinct marine environments. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 63: 1073-1082.

Hoehler T.M., M.J. Alperin, D.B. Albert & C.S. Martens, 1994. Field and laboratory studies of methane oxidation in an anoxic marine sediment: evidence for a methanogen-sulfate reducer consortium. *Glob. Biogeochem. Cy.* 8: 451-64.

Hollister E.B., A.S. Engledow, A.J.M. Hammett, T.L. Provin, H.H. Wilkinson & T.J. Gentry, 2010. Shifts in microbial

community structure along an ecological gradient of hypersaline soils and sediments. *ISME J.* 4: 829-838.

I

Imachi H., S. Sakai, Y. Sekiguchi, S. Hanada, Y. Kamagata, A. Ohashi & H. Harada, 2008. *Methanolinea tarda* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon isolated from a methanogenic digester sludge. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 58: 294-301.

IPCC (2007) Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the IPCC, eds Marquis M., Avery, K.B., Tignor M., Miller H.L. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

J

Jackson D. & H. Harvey, 1993. Fish and benthic invertebrates: community concordance and community-environment relationships. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50: 2641-2651.

Jackson D.A., 1995. PROTEST: a Procrustean randomization test of community environment. *Ecoscience* 2: 297-303.

Jackson C.R. & A.Q. Weeks, 2008. Influence of particle size on bacterial community structure in aquatic sediments as revealed by 16S rRNA gene sequence analysis. *Appl. Environ. Microb.* 74: 5237-5240.

Jacob M., T. Soltwedel, A. Boetius & A. Ramette, 2013. Biogeography of deep-sea benthic bacteria at regional scale (LTER HAUSGARTEN, Fram Strait, Arctic). *PLOS One* 8: e72779

Jacquet S., D. Barbet, S. Cachera, A. Caudron, M. Colon, C. Girel, J. Guillard,

A. Hébert, F. Kerrien, L. Laine, J. Lazzarotto, J-P. Moille, G. Paolini, M. Perga, P. Perney & F. Rimet, 2012. Suivi environnemental des eaux du lac du Bourget pour l'année 2011. *Rapport INRA-CISALB-CALB*, 220 pages.

Jacquet S., D. Barbet, S. Cachera, M. Colon, L. Espinat, C. Girel, J. Guillard, V. Hamelet, J.C. Hustache, F. Kerrien, D. Lacroix, L. Laine, C. Laplace-Tretyure, A. Meunier, G. Paolini, M. Perga, P. Perney & F. Rimet, 2014. Suivi environnemental des eaux du lac du Bourget pour l'année 2013. *Rapport INRA-CISALB-CALB*, 201 pages.

Jaun B. & R.K. Thauer, 2009. Nickel-alkyl bond formation in the active site of methyl-coenzyme M reductase. *Met. Ions Life Sci.* 6: 115-132.

Jenny J-P., 2013. Réponses des grands lacs périalpins aux pressions anthropiques et climatiques récentes. Reconstitutions spatio - temporelles à partir d'archives sédimentaires. Université de Savoie, p. 239.

Jenny J.P., F. Arnaud, J.M. Dorioz, C. Giguët-Covex, V. Frossard, P. Sabatier, L. Millet, J.L. Reyss, K. Tachikawa, E. Bard, C. Pignol, F. Soufi & M. E. Perga, 2013. A spatiotemporal investigation of varved sediments highlights the dynamics of hypolimnetic hypoxia in a large hard-water lake over the last 150 years. *Limnol. Oceanogr.* 58: 1395-1408.

Jetten M.S.M., A.J.M. Stams & A.J.B. Zehnder, 1992. Methanogenesis from Acetate - a Comparison of the Acetate Metabolism in *Methanotrix-Soehngenii* and *Methanosarcina Spp.* *FEMS Microbiol. Rev.* 88: 181-197.

Jiang H., et al., 2008. Dominance of putative marine benthic archaea in Qinghai Lake, north-western China. *Environ. Microbiol.* 10: 2355-2367.

Jones R.I., C.E. Carter, A. Kelly, S. Ward, D.J. Kelly & J. Grey, 2008. Widespread contribution of methane-cycle bacteria to the diets of lake profundal chironomid larvae. *Ecology* 89: 857-864.

Jones S.E. & J.T. Lennon, 2010. Dormancy contributes to the maintenance of microbial diversity. *PNAS* 107: 5881-5886.

Jones R.I. & J. Grey, 2011. Biogenic methane in freshwater food webs. *Freshwater Biol.* 56: 213-229.

Junier P., T. Junier & K-P. Witzel, 2008. TRiFLe, a program for in silico terminal restriction fragment length polymorphism analysis with user-defined sequences sets. *Appl. Environ. Microb.* 74: 6452-6456.

Juottonen H., P.E. Galand, E.S. Tuittila, J. Laine, H. Fritze & K. Yrjala, 2005. Methanogen communities and Bacteria along an ecohydrological gradient in a northern raised bog complex. *Environ. Microbiol.* 7: 1547-1557.

K

Kankaala P., S. Taipale, J. Grey, E. Sonninen, L. Arvola & R. I. Jones, 2006. Experimental $\delta^{13}\text{C}$ evidence for a contribution of methane to pelagic food webs in lakes. *Limnol. Oceanogr.* 51: 2821-2827.

Karlsson J., R. Giesler, J. Persson & E. Lundin, 2013. High emission of carbon dioxide and methane during ice thaw in high latitude lakes. *Geophys. Res. Lett.* 40: 1-5.

Kelly A., R.I. Jones & J. Grey, 2004. Stable isotope analysis provides fresh insights into dietary separation between *Chironomus anthracinus* and *C. plumosus*. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 23: 287-296.

Kendall M. & D. Boone, 2006. The Order *Methanosarcinales*. In The prokaryotes. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K-H., Stackebrandt E., Kendall M., and Boone D. (eds): Springer New York, pp. 244-256.

Kirschke S. et al, 2013. Three decades of global methane sources and sinks. *Nat. Geosci.* 6: 813-823.

Knittel K. et al., 2003. Activity, distribution, and diversity of sulfate reducers and other bacteria in sediments above gas hydrate (Cascadia margin, Oregon). *Geomicrobiol. J.* 20: 269-294.

Knittel K., T. Lösekann, A. Boetius, R. Kort & R. Amann, 2005. Diversity and distribution of methanotrophic archaea at cold seeps. *Appl. Environ. Microb.* 71: 467-79.

Knittel K. & A. Boetius, 2009. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 311-334.

Koizumi Y., S. Takii, M. Nishino & T. Nakajima, 2003. Vertical distributions of sulfate-reducing bacteria and methane-producing archaea quantified by oligonucleotide probe hybridization in the profundal sediment of a mesotrophic lake. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44: 101-108.

Kojima H., T. Iwata & M. Fukui, 2009. DNA-based analysis of planktonic methanotrophs in a stratified lake. *Freshwater Biol.* 54: 1501-1509.

Krause S., C. Lüke & P. Frenzel, 2010. Succession of methanotrophs in oxygen-methane counter-gradients of flooded rice paddies. *ISME J.* 4: 1603-1607.

Kruger M. et al., 2003. A conspicuous nickel protein in microbial mats that oxidize methane anaerobically. *Nature* 426: 878-881.

Kurr M., R. Huber, H. König, H.W. Jannasch, H. Fricke, A. Trincone, J.K. Kristjansson & K.O. Stetter, 1991. *Methanopyrus kandleri*, gen. and sp. nov. represents a novel group of hyperthermophilic methanogens, growing at 110°C. *Arch. Microbiol.* 156: 239-247.

L

Ledoux G., P. Lajeunesse, E. Chapron & G. St-Onge, 2010. Multibeam bathymetry investigations of mass movements in Lake Le Bourget (NW Alps, France) using a portable platform. Submarine mass movements and their consequences. *Adv. Nat. Technol. Hazards Res.* eds. Moscher DC; Shipp RC; Moscardelli L; Chaytor JD; Baxter CDP; Lee HJ; Urgeles R. 28: 423-434.

Leflaive J., R. Céréghino, M. Danger, G. Lacroix & L. Ten-Hage, 2005. Assessment of self-organizing maps to analyze sole-carbon source utilization profiles. *J. Microbiol. Meth.* 62: 89-102.

Lehours A-C., C; Bardot, A; Thenot, D. Debross & Gerard Fonty, 2005. Anaerobic microbial communities in Lake Pavin, a unique meromictic lake in France. *Appl. Environ. Microb.* 71: 7389-7400.

Lehours A.C., P. Evans, C. Bardot, K. Joblin & F. Gerard, 2007. Phylogenetic diversity of archaea and bacteria in the anoxic zone of a meromictic lake (Lake Pavin, France). *Appl. Environ. Microb.* 73: 2016-2019.

Leuko S., F. Goh, M.A. Allen, B.P. Burns, M.R. Walter & B.A. Neilan., 2007. Analysis of intergenic spacer region length polymorphisms to investigate the halophilic archaeal diversity of stromatolites and microbial mats. *Extremophiles* 11: 203-210.

Liikanen A. & P.J. Martikainen, 2003. Effect of ammonium and oxygen on

methane and nitrous oxide fluxes across sediment water interface in a eutrophic lake. *Chemosphere* 52: 1287-1293.

Liu F.H., G.H. Lin, G. Gao, B.Q. Qin, J.S. Zhang, G.P. Zhao, Z.H. Zhou & J.H. Shen, 2009. Bacterial and archaeal assemblages in sediments of a large shallow freshwater lake, Lake Taihu, as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Appl. Microbiol.* 106: 1022-1032.

Lloyd K.G., L. Lapham & A. Teske, 2006. An anaerobic methane-oxidizing community of ANME-1b archaea in hypersaline Gulf of Mexico sediments. *Appl. Environ. Microb.* 72: 7218-30.

Lloyd K.G., M.J. Alperin & A. Teske, 2011. Environmental evidence for net methane production and oxidation in putative ANaerobic MEthanotrophic (ANME) archaea. *Environ. Microbiol.* 13: 2548-2564.

Lösekann T., K. Knittel, T. Nadalig, B. Fuchs, H. Niemann, A. Boetius & R. Amann, 2007. Diversity and Abundance of Aerobic and Anaerobic Methane Oxidizers at the Haakon Mosby Mud Volcano, Barents Sea. *Appl. Environ. Microb.* 73: 3348-3362.

Lueders T. & M. W. Friedrich, 2003. Evaluation of PCR amplification bias by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of small-subunit rRNA and *mcrA* genes by using defined template mixtures of methanogenic pure cultures and soil DNA extracts. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 320-326.

Luna G.M., K. Stumm, A. Pusceddu & R. Danovaro, 2009. Archaeal diversity in deep-sea sediments estimated by means of different terminal-restriction fragment length polymorphisms (T-RFLP) protocols. *Curr. Microbiol.* 59: 356-361.

Luton P.E., J.M. Wayne, R.J. Sharp & P.W. Riley, 2002. The *mcrA* gene as an

alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology* 148: 3521-3530.

Lozupone C. & R. Knight, 2005. UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Appl Environ. Microbiol.* 71: 8228-8235.

Lyautey E., A. Cournet, S. Morin, S. Boulêtreau, L. Etcheverry, J.Y. Charcosset, F. Delmas, A. Bergel & F. Garabetian, 2011. Electroactivity of phototrophic river biofilms and constitutive cultivable Bacteria. *Appl. Environ. Microb.* 77: 5394-5401.

M

Ma K. & Y. Lu, 2011. Regulation of microbial methane production and oxidation by intermittent drainage in rice field soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 75: 446-456.

Ma K., R. Conrad & Y. Lu, 2013. Dry/wet cycles change the activity and population dynamics of methanotrophs in rice field soil. *Appl. Environ. Microb.* 79: 4932-4939.

Macalady J-L., A.M.S. McMillan, A.F. Dickens, S.C. Tyler & K.M. Scow, 2002. Population dynamics of type I and II methanotrophic bacteria in rice soils. *Environ. Microbiol.* 4: 148-157.

Madsen E.L., 2011. Microorganisms and their roles in fundamental biogeochemical cycles. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22: 456-464.

Martens C.S. & R.A. Berner, 1974. Methane production in interstitial waters of sulfate-depleted marine sediments. *Science* 185: 1167-1169.

McDonald I.R., L. Bodrossy, Y. Chen & J.C. Murrel, 2008. Molecular ecology techniques for the study of aerobic

methanotrophs. *Appl. Environ. Microb.* 74: 1305-1315.

Mihajlovski A., M. Alric & J.F. Brugere, 2008. A putative new order of methanogenic Archaea inhabiting the human gut, as revealed by molecular analyses of the *mcrA* gene. *Res. Microbiol.* 159: 516-521.

Mihajlovski A., J. Dore, F. Levenez, M. Alric & J.F. Brugere, 2010. Molecular evaluation of the human gut methanogenic archaeal microbiota reveals an age-associated increase of the diversity. *Environ. Microbiol. Rep.* 2: 272-280.

Milucka J., M. Kirf, L. Lu, A. Krupke, P. Lam, S. Littmann, M.M.M. Kuypers & C.J. Schubert, 2015. Methane oxidation coupled to oxygenic photosynthesis in anoxic waters. *ISME J.* doi:10.1038/ismej.2015.12

Mohanty S.R., P.L.E. Bodelier, V. Floris & R. Conrad, 2006. Differential Effects of Nitrogenous Fertilizers on Methane-Consuming Microbes in Rice Field and Forest Soils. *Appl. Environ. Microb.* 72: 1346-1354.

Mondav R., B.J. Woodcroft, E-H. Kim, C.K. McCalley, S.B. Hodgkins, P.M. Crill, J. Chanton, G.B. Hurst, N.C. VerBerkmoes, S.R. Saleska, P. Hugenholtz, V.I. Rich & G.W. Tyson, 2013. Discovery of a novel methanogen prevalent in thawing permafrost. *Nat. Commun.* 5: 3212.

Murase J., Y. Sakai, A. Sugimoto, K. Okubo & M. Sakamoto, 2003. Sources of dissolved methane in Lake Biwa. *Limnology* 4: 91-99.

Murase J. & A. Sugimoto, 2005. Inhibitory effect of light on methane oxidation in the pelagic water column of a mesotrophic lake (Lake Biwa, Japan). *Limnol. Oceanogr.* 50: 1339-1343.

Murase J. & P. Frenzel, 2007. A methane-driven microbial food web in a wetland rice soil. *Environ. Microbiol.* 9: 3025-3034.

Murase J. & P. Frenzel, 2008. Selective grazing of methanotrophs by protozoa in a rice field soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 65: 408-414.

Murrel J.C., B. Gilbert & I.R. McDonald, 2000. Molecular biology and regulation of methane monooxygenase. *Arch. Microbiol.* 173: 325-332.

Muyzer G. & K. Smalla, 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *A. van Leeuw.* 73: 127-141.

N

Nam Y.D., Y. Sung, H.W. Chang, S.W. Roh, K.H. Kim, S.K. Rhee, J.C. Kim, J.Y. Kim, J.H. Yoon & J. W. Bae, 2008. Characterization of the depth-related changes in the microbial communities in Lake Hovsgol sediment by 16S rRNA gene-based approaches. *J. Microbiol.* 46: 125-136.

Narihiro T. & Y. Sekiguchi, 2011. Oligonucleotide primers, probes and molecular methods for the environmental monitoring of methanogenic archaea. *Microbial. Biotechnol.* 4: 585-602.

Nold S.C., H.T.S. Bergmann, R. Pel & H.J. Laanbroek, 1999. Ammonium addition inhibits C-13 methane incorporation into methanotroph membrane lipids in a freshwater sediment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29: 81-89.

Nolla-Ardèvol V., M. Strous, D.Y. Sorokin, A.Y. Merkel & H.E. Tegetmeyer, 2012. Activity and diversity of haloalkaliphilic methanogens in Central

Asian soda lakes. *J. Biotechnol.* 161: 167-173.

Normand P., C. Ponsonnet, X. Nesme, M. Neyra & P. Simonet, 1996. ITS analysis of prokaryotes. In Akkermans D.L., J.D. van Elsas & F.J. de Bruijn (eds) *Molecular microbial ecology manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1-12.

O

Oksanen J., F.G. Blanchet, R. Kindt, P. Legendre, P.R. Minchin, R.B. O'Hara, G.L. Simpson, P. Solymos, M.H.H. Stevens & H. Wagner, 2013. *vegan: community Ecology Package*. R package version 2.0-6. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>

Oliveros J.C., 2007. Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.

Orphan V.J., C.H. House, K.U. Hinrichs, K.D. McKeegan & E.F. DeLong, 2001. Methane-consuming archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis. *Science* 293: 484-487.

Orphan V.J., L.L. Jahnke, T. Embaye, K.A. Turk, A. Pernthaler, R.E. Summons & D.J. DesMarais, 2008. Characterization and spatial distribution of methanogens and methanogenic biosignatures in hypersaline microbial mats of Baja California. *Geobiology* 6: 376-393.

Osborne C.A., G.N. Rees, Y. Bernstein, & P.H. Janssen, 2006. New threshold and confidence estimates for terminal restriction fragment length polymorphism analysis of complex bacterial communities. *Appl. Environ. Microb.* 72: 1270-1278.

P

Paavola R., T. Muotka, R. Virtanen, J. Heino, D. Jackson & A. Maki-Petäys,

2006. Spatial scale affects community concordance among fishes, benthic macroinvertebrates, and bryophytes in streams. *Ecol. Appl.* 16: 368-379.

Paerl H.W. & T.F. Steppe, 2003. Scaling up: the next challenge in environmental microbiology. *Environ. Microbiol.* 5: 1025-1038.

Palma-Silva C., C.C. Marinho, E.F. Albertoni, I.B. Giacomini, M.P. Figueiredo Barros, L.M. Furlanetto, C.R. Trindade & F. de Assis Esteves, 2013. Methane emissions in two small shallow neotropical lakes: The role of temperature and trophic level. *Atmos. Environ.* 81: 373-379.

Peres-Neto P.R. & D.A. Jackson, 2001. How well do multivariate data sets match? Evaluating the association of multivariate biological data sets: comparing the robustness of Mantel test and a Procrustean superimposition approach. *Oecologia* 129: 169-178.

Pester M., M.W. Friedrich, B. Schink & A. Brune, 2004. *pmoA*-Based analysis of methanotrophs in a littoral lake sediment reveals a diverse and stable community in a dynamic environment. *Appl. Environ. Microb.* 70: 3138-3142.

Peter H., S. Beier, S. Bertilsson, E.S. Lindstrom, S. Langenheder & L.J. Tranvik, 2011. Function-specific response to depletion of microbial diversity. *ISME J.* 5:351-361.

Pommier T., A. Merroune, Y. Bettarel, P. Got, J-L. Janeau, P. Jouquet, T.D. Thu, T.D. Toan & E. Rochelle-Newall, 2014. Off-site impacts of agricultural composting: role of terrestrially derived organic matter in structuring aquatic microbial communities and their metabolic potential. *FEMS Microbiol. Ecol.* 90: 622-632.

Pourriot R. & M. Meybeck, 1995. (eds). *Limnologie Générale*, Masson, Paris, 956 p.

Priscu J.C., C.H. Fritsen, E.E. Adams, S.J. Giovannoni, H.W. Paerl, C.P. McKay, P.T. Doran, D.A. Gordon, B.D. Lanoil & J.L. Pinckney, 1998. Perennial antarctic lake ice: an oasis for life in a polar desert. *Science* 280: 2095-2098.

R

R Development Core Team, 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.r-project.org/>

Raghoebarsing A.A., A. Pol, K.T. van de Pas-Schoonen, A.J.P. Smolders, K.F. Ettwig, W.I.C. Rijpstra, S. Schouten, J.S.S. Damste, H.J.M. Op den Camp, M.S. Jetten & M. Strous, 2006. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature* 440: 918-921.

Rahalkar M. & B. Schink, 2007. Comparison of aerobic methanotrophic communities in littoral and profundal sediments of Lake Constance by a molecular approach. *Appl. Environ. Microb.* 73: 4389-4394.

Rahalkar M., J. Deutzmann, B. Schink & I. Bussmann, 2009. Abundance and activity of methanotrophic bacteria in littoral and profundal sediments of Lake Constance (Germany). *Appl. Environ. Microb.* 75: 119-126.

Ramette A., 2009. Quantitative community fingerprinting methods for estimating the abundance of operational taxonomic units in natural microbial communities. *Appl. Environ. Microb.* 75: 2495-2505.

Ranjard L., F. Poly, J. Combrisson, A. Richaume, F. Gourbiere, J. Thioulouse & S. Nazaret, 2000. Heterogeneous Cell Density and Genetic Structure of Bacterial Pools Associated with Various Soil Microenvironments as Determined by Enumeration and DNA Fingerprinting Approach (RISA). *Microbial. Ecol.* 39: 263-272.

Reeburgh W.S., 1976. Methane consumption in Cariaco trench waters and sediments. *Earth Planet Sci. Lett.* 28: 337-344.

Reeburgh W.S., 2007. Oceanic methane biogeochemistry. *Chem. Rev.* 107: 486-513.

Reitner J., J. Peckmann, M. Blumenberg, W. Michaelis, A. Reimer & V. Thiel, 2005. Concretionary methane seep carbonates and associated microbial communities in Black Sea sediments. *Palaogeogr. Paleoclimatol. Paleoecol.* 227: 18-30.

Röske K., R. Sachse, C. Scheerer & I. Röske, 2012. Microbial diversity and composition of the sediment in the drinking water reservoir Saldenbach (Saxonia, Germany). *Syst. Appl. Microbiol.* 35: 35-44.

Roslev P. & G.M. King, 1996. Regulation of methane oxidation in a freshwater wetland by water table changes and anoxia. *FEMS Microbiol. Ecol.* 19: 105-115.

Rothfuss F., M. Bender & R. Conrad, 1997. Survival and activity of bacteria in a deep, aged lake sediment (Lake Constance). *Microb. Ecol.* 33: 69-77.

Roussel E.G., A.L. Sauvadet, J. Allard, C. Chaduteau, P. Richard, M.A. Cambon Bonavita & E. Chaumillon, 2009. Archaeal methane cycling communities associated with gassy subsurface sediments of Marennes-Oléron Bay (France). *Geomicrobiol. J.* 26: 31-43.

S

- Sait L.**, M. Galic, R.A. Strugnell & P.H. Janssen, 2003. Secretory antibodies do not affect the composition of the bacterial microbiota in the terminal ileum of 10-week-old mice. *Appl. Environ. Microb.* 69: 2100-2109.
- Sakai S.**, H. Imachi, S. Hanada, A. Ohashi, H. Harada & Y. Kamagata, 2008. *Methanocella paludicola* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon, the first isolate of the lineage 'Rice Cluster I', and proposal of the new archaeal order *Methanocellales* ord. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 929-936.
- Sakai S.**, H. Imachi, Y. Sekiguchi & I. Tseng, 2009. Cultivation of methanogens under low-hydrogen conditions by using the coculture method. *Appl. Environ. Microb.* 75: 4892-4896.
- Sapp M.**, E.R. Parker, L.R. Teal & M. Schratzberger, 2010. Advancing the understanding of biogeography-diversity relationships of benthic microorganisms in the North Sea. *FEMS Microbiol. Ecol.* 74: 410-429.
- Savichtcheva O.**, D. Debroas, M.E. Perga, F. Arnaud, C. Villar, E. Lyautey, A. Kirkham, C. Chardon, B. Alric & I. Domaizon, 2015. Effects of nutrients and warming on *Planktothrix* dynamics and diversity: a paleolimnological view based on sedimentary DNA and RNA. *Freshwater Biol.* 60: 31-49.
- Scala D.J. & L.J. Kerkhof**, 2000. Horizontal heterogeneity of denitrifying bacterial communities in marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Appl. Environ. Microb.* 66: 1980-1986.
- Scheller S.**, M. Goenrich, R. Boecher, R.K. Thauer & B. Jaun, 2011. The key nickel enzyme of methanogenesis catalyses the anaerobic oxidation of methane. *Nature* 465: 606-609.
- Schilder J.**, D. Bastviken, M. van Hardenbroek, P. Kankaala, P. Rinta, T. Stoetter & O. Heiri, 2013. Spatial heterogeneity and lake morphology affect diffusive greenhouse gas emission estimates of lakes. *Geophys. Res. Lett.* 40: 5752-5756.
- Schirmack J.**, K. Mangelsdorf, L. Ganzert, W. Sand, A. Hillebrand-Voiculescu & D. Wagner, 2014. *Methanobacterium movilense* sp. nov., a hydrogenotrophic, secondary-alcohol-utilizing methanogen from the anoxic sediment of a subsurface lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64: 522-527.
- Schmid M.**, M. De Batist, N.G. Granin, V.A. Kapitanov, D.F. McGinnis, I.B. Mizandrontsev, A.I. Obzhirrov & A. Wüest, 2007. Sources and sinks of methane in Lake Baikal: A synthesis of measurements and modeling. *Limnol. Oceanogr.* 52: 1824-1837.
- Schloss P.D. & J. Handelsman**, 2005. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1501-1506.
- Schubert C.J.**, F.S. Lucas, E. Durisch-Kaiser, R. Stierli, T. Diem, O. Scheidegger, F. Vazquez & B. Muller, 2010. Oxidation and emission of methane in a monomictic lake (Rotsee, Switzerland). *Aquat. Sci.* 72: 455-466.
- Schubert C.J.**, F. Vazquez, T. Lösekann-Behrens, K. Knittel, M. Tonolla & A. Boetius, 2011. Evidence for anaerobic oxidation of methane in sediments of a freshwater system (Lago di Cadagno). *FEMS Microbiol. Ecol.* 76: 26-38.
- Schulz S. & R. Conrad**, 1995. Effect of algal deposition on acetate and methane concentration in the profundal sediment of a deep lake (Lake Constance). *FEMS Microbiol. Ecol.* 16: 251-259.

- Schultz P. & N.R. Urban**, 2008. Effects of bacterial dynamics on organic matter decomposition and nutrient release from sediments: a modeling study. *Ecol. Model.* 210: 1-14.
- Schwarz J.I.K.**, W. Eckert & R. Conrad, 2007. Community structure of Archaea and Bacteria in a profundal lake sediment Lake Kinneret (Israel). *Syst. Appl. Microbiol.* 30: 239-254
- Schwarz J.I.K.**, W. Eckert & R. Conrad, 2008. Response of the methanogenic microbial community of a profundal lake sediment (Lake Kinneret, Israel) to algal deposition. *Limnol. Oceanogr.* 53: 113-121.
- Semrau J.D.**, A. Chistoserdov, J. Lebron, A. Costello, J. Davagnino, E. Kenna, A.J. Holmes, R. Finch, J.C. Murrell & M.E. Lidstrom, 1995. Particulate methane monooxygenase genes in methanotrophs. *J. Bacteriol.* 177: 3071-3079.
- Semrau J.D.**, A.A. DiSpirito & S. Yoon, 2010. Methanotrophs and copper. *FEMS Microbiol. Rev.* 34: 496-531.
- Shima S. & R.K. Thauer**, 2005. Methyl-coenzyme M reductase and the anaerobic oxidation of methane in methanotrophic Archaea. *Curr. Opin. Microbiol.* 8: 643-648.
- Shimizu S.**, M. Akiyama, T. Naganuma, M. Fujioka, M. Nako & Y. Ishijima, 2007. Molecular characterization of microbial communities in deep coal seam groundwater of northern Japan. *Geobiology* 5: 423-33.
- Shivaji S.**, K. Kumari, K.H. Kishore, P.K. Pindi, P.S. Rao, T.N.R. Srinivas, R. Asthana & R. Ravindra, 2011. Vertical distribution of bacteria in a lake sediment from Antarctica by culture-independent and culture-dependent approaches. *Res. Microbiol.* 162: 191-203.
- Shrestha M.**, W.-R. Abraham, P.M. Shrestha, M. Noll & R. Conrad, 2008. Activity and composition of methanotrophic bacterial communities in planted rice soil studied by flux measurements, analyses of *pmoA* gene and stable isotope probing of phospholipid fatty acids. *Environ. Microbiol.* 10: 400-412.
- Shrestha M.**, P.M. Shrestha, P. Frenzel & R. Conrad, 2008. Effect of nitrogen fertilization on methane oxidation, abundance, community structure, and gene expression of methanotrophs in the rice rhizosphere. *ISME J.* 4: 1545-1556.
- Siljanen H.M.P.**, A. Saari, L. Bodrossy & P.J. Martikainen, 2012. Seasonal variation in the function and diversity of methanotrophs in the littoral wetland of a boreal eutrophic lake. *FEMS Microbiol. Ecol.* 80: 548-555.
- Sobek S. et al.**, 2009. Organic carbon burial efficiency in lake sediments controlled by oxygen exposure time and sediment source. *Limnol. Oceanogr.* 54: 2243-2254.
- Soja G.**, B. Kitzler & A-M. Soja, 2014. Emissions of greenhouse gases from Lake Neusiedl, a shallow steppe lake in Eastern Austria. *Hydrobiologia* 731: 125-138.
- Sollberger S.**, J.P. Corella, S. Girardclos, M.E. Randlett, C.J. Schubert, D.B. Senn, B. Wehrli & T. DelSontro, 2014. Spatial heterogeneity of benthic methane dynamics in the subaquatic canyons of the Rhone River Delta (Lake Geneva). *Aquat. Sci.* 76: 89-101.
- Solomon S.**, 2007. Climate change 2007: the physical science basis. Cambridge: Cambridge University Press
- Springer E.**, M.S. Sachs, C.R. Woese & D.R. Boone, 1995. Partial gene sequences for the a subunit of methyl-coenzyme M reductase (*mcrI*) as a phylogenetic tool for

the family *Methanosarcinaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 554-559.

Stams A.J.M. & C.M. Plugge, 2009. Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* 7: 568-577.

Stein L.Y., M.T. La Duc, T.J. Grundl & K.H. Nealson, 2001. Bacterial and archaeal populations associated with freshwater ferromanganous micronodules and sediments. *Environ. Microbiol.* 3: 10-18.

Steinberg L.M. & J.M. Regan, 2008. Phylogenetic comparison of the methanogenic communities from an acidic, oligotrophic fen and an anaerobic digester treating municipal wastewater sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 6663-6671.

Stoecker K., B. Bendinger, B. Schoning, P.H. Nielsen, J.L. Nielsen, C. Baranyi, E.R. Toenshoff, H. Daims & M. Wagner, 2006. Cohn's *Crenothrix* is a filamentous methane oxidizer with an unusual methane monooxygenase. *PNAS* 103: 2363-2367.

Stolyar S., A.M. Costello, T.L. Peebles & M.E. Lidstrom, 1999. Role of multiple gene copies in particulate methane monooxygenase activity in the methane-oxidizing bacterium *Methylococcus capsulatus* Bath. *Microbiology* 145: 1235-1244.

Surakasi V., A. Wani, Y. Shouche & D. Ranade, 2007. Phylogenetic Analysis of Methanogenic Enrichment Cultures Obtained from Lonar Lake in India: Isolation of *Methanocalculus* sp. and *Methanoculleus* sp. *Microbial. Ecol.* 54: 697-704.

Surakasi V.P., C.P. Antony, S. Sharma, M.S. Patole & Y.S. Shouche, 2010. Temporal bacterial diversity and detection of putative methanotrophs in surface mats of Lonar crater lake. *J. Basic Microb.* 50: 465-474.

Swan B.K., C.J. Ehrhardt, K.M. Reifel, L.I. Moreno & D.L. Valentine., 2010. Archaeal and Bacterial communities respond differently to environmental gradients in anoxic sediments of a California hypersaline lake, the Salton Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 757-768.

T

Tamura K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski & S. Kumar, 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725-2729.

Tang K.W., D. F. McGinnis, K. Frindte, V. Brüchert & H-P. Grossart, 2014. Paradox reconsidered: Methane oversaturation in well-oxygenated lake waters. *Limnol. Oceanogr.* 59: 275-284.

Tavormina P.L., W. Ussler, S.B. Joye, B.K. Harrison & V.J. Orphan, 2010. Distributions of putative aerobic methanotrophs in diverse pelagic marine environments. *ISME J.* 4: 700-710.

Teske A., A. Durbin, K. Ziervogel, C. Cox & C. Arnosti, 2011. Microbial community composition and function in permanently cold seawater and sediments from an Arctic fjord of Svalbard. *Appl. Environ. Microb.* 77: 2008-2018.

Thauer R.K., 1998. Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology* 144: 2377-2406.

Thauer R.K. & S. Shima, 2008. Methane as fuel for anaerobic microorganisms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1125: 158-170.

Tranvik L.J., J.A. Downing, J.B. Cotner, S.A. Loiselle, R.G. Striegl, T.J. Ballatore, P. Dillon, K. Finlay, K. Fortino, et al., 2009. Lakes and reservoirs as regulators of carbon cycling and climate. *Limnol. Oceanogr.* 54: 2298-2314.

Trolle D., G. Zhu, H. Hamilton, L. Luo, C. McBride & L. Zhang, 2009. The influence

of water quality and sediment geochemistry on the horizontal and vertical distribution of phosphorus and nitrogen in sediments of a large, shallow lake. *Hydrobiologia* 627: 31-44.

Tšertova N., A. Kisand, F. Baty & V. Kisand, 2013. Homogeneous microbial diversity in the upper sediment layers of a shallow lake. *Aquat. Microb. Ecol.* 70: 77-85.

Tsutsumi M., T. Iwata, H. Kojima & M. Fukui, 2011. Spatiotemporal variations in an assemblage of closely related planktonic aerobic methanotrophs. *Freshwater Biol.* 56: 342-351.

V

Valentine D.L., 2002. Biogeochemistry and microbial ecology of methane oxidation in anoxic environments: a review. *Anton. Leeuw.* 81: 271-282.

van Bodegom P., F. Stams, L. Mollema, S. Boeke & P. Leffelaar, 2001. Methane oxidation and the competition for oxygen in the rice rhizosphere. *Appl. Environ. Microb.* 67: 3586-3597.

van Teeseling M.C.F., A. Pol, H.R. Harhangi, S. van der Zwart, M.S.M. Jetten, H.J.M. Op den Camp & L. van Niftrik, 2014. Expanding the Verrucomicrobial Methanotrophic World: Description of Three Novel Species of *Methylacidimicrobium* gen. nov. *Appl. Environ. Microb.* 80: 6782-6791.

Vigliotta G., E. Nutricati, E. Carata, S.M. Tredici, M. De Stefano, P. Pontieri, D.R. Massardo, M.V. Prati, L. De Bellis & P. Alifano, 2007. *Clonothrix fusca* Roze 1896, a filamentous, sheathed, methanotrophic gamma-proteobacterium. *Appl. Environ. Microb.* 73: 3556-3565.

W

West W.E., J.J. Coloso & S.E. Jones, 2012. Effects of algal and terrestrial carbon on methane production rates and methanogen community structure in a temperate lake sediment. *Freshwater Biol.* 57: 949-955.

Wetzel R.G., 2000. Freshwater ecology: changes, requirements, and future demands. *Limnology* 1: 3-9.

Whitman W.B., D.C. Coleman & W.J. Wiebe, 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *PNAS.* 95: 6578-6583.

Whittenbury R., S.L. Davies & J.F. Davey, 1970. Exospores and cysts formed by methane-utilizing bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 61: 219-226.

Wu L., L. Kellogg, A.H. Devol, J.M. Tiedje & J. Zhou, 2008. Microarray-based characterization of microbial community functional structure and heterogeneity in marine sediments from the Gulf of Mexico. *Appl. Environ. Microb.* 74: 4516-4529.

Y

Yang H., P. Xie, L. Ni & R.J. Flower, 2011. Underestimation of CH₄ Emission from freshwater lakes in China. *Environ. Sci. Technol.* 45: 4203-4204.

Ye W.J., X.L. Liu, S.Q. Lin, J. Tan, J.L. Pan, D.T. Li & H. Yang, 2009. The vertical distribution of bacterial and archaeal communities in the water and sediment of Lake Taihu. *FEMS Microbiol. Ecol.* 70: 263-276.

Yun J., G. Zhuang, A. Ma, H. Guo, Y. Wang & H. Zhang, 2012. Community structure, abundance, and activity of methanotrophs in the Zoige wetland of the Tibetan plateau. *Microbiol. Ecol.* 63: 835-843.

Z

Zhang G., J. Tian, N. Jiang, X. Guo, Y. Wang & X. Dong, 2008. Methanogen community in Zoige wetland of Tibetan plateau and phenotypic characterization of a dominant uncultured methanogen cluster ZC I. *Environ. Microbiol.* 10: 1850-1860.

Zhang S., C. Guo, C. Wang, J. Gu, P. Wang, Y. Hui & B. Han, 2014. Detection of methane biogenesis in a shallow urban lake in summer. *J. Soils Sediments* 14: 1004-1012.

Zelege J., S-L. Lu, J.G.Wang, J.X. Huang, B. Li, A.V. Ogram & Z.X. Quan, 2013. Methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) gene-based investigation of methanogens in the mudflat sediments of Yangtze River Estuary, China. *Microb. Ecol.* 66: 257-267.

